



การพัฒนาเทคนิคตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐาน
ระเบิดแสวงเครื่องโดยใช้สารเรืองแสง
**Visualization of Touch DNA from Improvised Explosive Device (IED)
Evidence**

เปรมกมล ตันครองจันทร์
Premkamon Tonkrongjun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Forensic Science
Prince of Songkla University**

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การพัฒนาเทคนิคตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐาน
ระเบิดแสวงเครื่องโดยใช้สารเรืองแสง
**Visualization of Touch DNA from Improvised Explosive Device (IED)
Evidence.**

เปรมกมล ตันครองจันทร์
Premkamon Tonkrongjun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree
of Master of Science in Forensic Science
Prince of Songkla University**

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิคตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิด
 แสงเครื่องโดยใช้สารเรืองแสง

ผู้เขียน นางสาวเปรมกมล ตันครองจันทร์

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวดีล ธนะเกียรติไกร)

.....ประธานกรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวดีล ธนะเกียรติไกร)

.....
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุติกา กิจพิพิธ)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุติกา กิจพิพิธ)

.....กรรมการ
 (ดร. เกร็อวัลย์ ยุนรัมย์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็น
 ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....
 (ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ศักดิ์ ฟ้ารุ่งสว่าง)
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ชนะเกียรติไกร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตา กิจพิพิธ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นางสาวเปรมกมล ตันครองจันทร์)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวเปรมกมล ตันครองจันทร์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐาน ระเบิดแสวงเครื่องโดยใช้สารเรืองแสง
ผู้เขียน	นางสาวเปรมกมล ตันครองจันทร์
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

เหตุการณ์ความไม่สงบในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้เกิดขึ้นมาอย่างยาวนาน ส่งผลให้เกิดความสูญเสียในชีวิต ทรัพย์สิน และความมั่นคงของประเทศ โดยหนึ่งในรูปแบบการก่อเหตุที่นิยมใช้มากที่สุดคือการวางระเบิด โดยเฉพาะระเบิดแสวงเครื่อง ซึ่งสามารถประกอบขึ้นจากวัสดุที่มีอยู่ในท้องถิ่น การประกอบและขนย้ายระเบิดแสวงเครื่องด้วยมือเปล่า ย่อมเกิดการหลุดลอกของเซลล์ผิวหนังจากผู้ก่อการร้ายไปสู่ส่วนประกอบของระเบิด ทำให้สามารถตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอและเชื่อมโยงสู่ผู้กระทำผิดได้ อย่างไรก็ตาม การตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องมีอัตราความสำเร็จต่ำ เนื่องจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสมีปริมาณน้อยและไม่สามารถมองเห็นหรือระบุตำแหน่งบนหลักฐานได้อย่างชัดเจน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาชุดน้ำยาสารเรืองแสงที่มีประสิทธิภาพในการตรวจระบุตำแหน่งของเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสบนวัสดุระเบิดแสวงเครื่อง ร่วมกับการตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคทีฟซีอาร์ ผลการศึกษาพบว่า สามารถพัฒนาชุดน้ำยาสารเรืองแสงและกระบวนการดังกล่าวได้สำเร็จ โดยใช้สารเรืองแสง SYBR® Green ที่ความเข้มข้น 0.9 เท่า ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยที่สุด ชุดน้ำยาสารเรืองแสงความเข้มข้นนี้สามารถเก็บรักษาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 วัน โดยยังปรากฏการเรืองแสงที่เข้มในระดับมากที่สุด นอกจากนี้ พบว่าชุดน้ำยาสารเรืองแสงและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นให้อัตราความสำเร็จในการตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องจำลองสูงถึงร้อยละ 14.7 และสูงกว่ากระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Thesis Title	Visualization of touch DNA from improvised explosive device (IED) evidence.
Author	Miss Premkamon Tonkrongjun
Major Program	Forensic Science
Academic Year	2018

ABSTRACT

Bombing cases are the second most frequent means of attack in the Southern Thailand's insurgency. Improvised explosive devices or IEDs are made from household items, and the assembling process usually results in the deposition of touch DNA on the IEDs. However, STR typing from touch DNA mostly results in low success rates due to the low amount of DNA available and our inability to locate areas where they have been deposited. To solve this problem, six fluorescent DNA-binding dyes were evaluated at various concentrations to find the most efficient dye for touch DNA visualization that could also be used with direct PCR to increase success rates of STR typing from IED substrates. I found that SYBR® Green I at 0.9X and Diamond™ dye at 1.4X concentration were the two most efficient dyes. STR profiles from stained samples were investigated and indicated that Diamond™ dye inhibited PCR and resulted in fewer alleles when compared to SYBR® Green I; thus 0.9X of SYBR® Green I was chosen for further testing. The prepared SYBR® Green I dye was stable up to 24 h when stored in -20°C. Ten mock IEDs were constructed and investigated either using the developed method (visualization and direct PCR) in our laboratory or with the conventional method at a forensic police laboratory. The results showed that developed method produced significantly more alleles from the IED's constructor (95% HDI: 0.7 to 10.0 alleles) and led to a decrease in non-donor's allele. Moreover, the fluorescence level was directly correlated to the number of alleles obtained. The developed method has the potential to transform the way forensic scientists work with evidence potentially containing touch DNA.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภูวดล ชนะเกียรติไกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติกา กิจพิพิธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำแนะนำแนวทางในการศึกษาหาความรู้ การปฏิบัติการทดลอง และแนวทางในการวิเคราะห์ผลการทดลอง รวมถึงช่วยปรับปรุงแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์เพื่อให้ออกมาสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค และ ดร.เครือวัลย์ ยุธรรมย์ ที่สละเวลามาเป็นประธานและกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมถึงแนะนำชี้แนะเนื้อหาเพิ่มเติมเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการศึกษาเป็นผู้ช่วยวิจัย (Research Assistance) (สัญญาเลขที่ 1-2558-02-004) และขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณชุดโครงการอุตสาหกรรมความมั่นคงและเทคโนโลยีอวกาศ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัย (สัญญาเลขที่ RDG6050130)

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย รวมถึงสถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสสำหรับจัดทำรูปแบบสารพันธุกรรม

ผู้วิจัยขอขอบคุณพันตำรวจเอกหญิงวรรณรัตน์ นองมณี นักวิทยาศาสตร์ สบ. 4 กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 ที่ให้ความอนุเคราะห์เข้าใช้สถานที่และเครื่องกำเนิดแสงทางเลี้ยวทอดการศึกษา และพันตำรวจตรีหญิงสุกัญญา เพชรเพ็ง นักวิทยาศาสตร์ สบ. 2 กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 ที่สละเวลาร่วมตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอในการทดลองด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐาน รวมถึงให้คำแนะนำและแนวทางการปฏิบัติการทดลอง

(8)

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัว คณะอาจารย์ นักศึกษาปริญญาโท สาขา
นิติวิทยาศาสตร์ทุกท่าน นางสาวไลลา หาททรัพย์ และนางสาวกฤติกา ระเหม ที่ให้ความ
ช่วยเหลือ แนะนำ ชี้แนะ รวมถึงเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาในการวิจัยครั้งนี้

เปรมกมล ตันครองจันทร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(5)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
รายการผลงานตีพิมพ์	(15)
List of permission	(16)
บทที่ 1 บทนำ	1
1. บทนำต้นเรื่อง	1
2. การตรวจเอกสาร	4
3. วัตถุประสงค์	21
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	22
1. การเตรียมวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	22
2. การเตรียมตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสบนวัสดุระเบิดแสงเครื่อง	25
3. การเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารเรืองแสงสำหรับใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง	26
4. การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัส	28
5. การสกัดดีเอ็นเอ	30
6. การวัดปริมาณดีเอ็นเอ	31
7. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	31
8. การแยกและตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส	32
9. การวิเคราะห์ข้อมูล	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ผลการทดลอง	34
1. ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารเรืองแสงสำหรับใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง	34
2. ผลการศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสง SYBR® Green และ Diamond™ Dye ต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	37
3. ผลการศึกษาอายุการใช้งานและวิธีการเก็บรักษาสารเรืองแสงที่พัฒนาขึ้น	41
4. การทดสอบการใช้งานจริงของชุดน้ำยาสารเรืองแสงร่วมกับกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอแบบไดเรคทีวี่อาร์กับตัวอย่างระเบิดแสงเครื่องจำลอง	43
บทที่ 4 วิเคราะห์ผลการทดลอง	49
1. คุณสมบัติและการเลือกใช้สารเรืองแสงที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาดีเอ็นเอจากการสัมผัส	49
2. ผลกระทบของสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain และ Diamond™ Nucleic Acid Dye ต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	51
3. ปัจจัยที่ส่งผลต่ออายุการใช้งานและวิธีการเก็บรักษาสารเรืองแสงที่พัฒนาขึ้น	52
4. การทดสอบการใช้งานจริงของชุดน้ำยาสารเรืองแสงร่วมกับกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอแบบไดเรคทีวี่อาร์กับตัวอย่างระเบิดแสงเครื่องจำลอง	54
5. การศึกษาผลบวกปลอม (Artifact)	56
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	57
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	68
1. ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัส	69
2. ต้นฉบับสำหรับดีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	83
ประวัติผู้เขียน	86

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายละเอียดของสารเรืองแสงที่มีรายงานการใช้สำหรับงานชีววิทยาระดับ โมเลกุล	9
ตารางที่ 2 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	31
ตารางที่ 3 สรุปเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสารเรืองแสงและกระบวนการ ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ และกระบวนการมาตรฐานของตำรวจ พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ	58

รายการภาพประกอบ

	หน้า
ภาพที่ 1 วิธีการเตรียมวัสดุเทปกาวพันสายไฟโดยการวางภายใต้รังสียูวี	22
ภาพที่ 2 วิธีการเตรียมวัสดุแผงวงจรไฟฟ้าโดยการล้างในน้ำยาล้างจาน, สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และการวางภายใต้รังสียูวี	23
ภาพที่ 3 วิธีการเตรียมวัสดุท่อพีวีซีโดยการล้างในน้ำยาล้างจาน, สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และการวางภายใต้รังสียูวี	23
ภาพที่ 4 วัสดุที่ใช้ในการประกอบระเบิดแสงเครื่องจำลอง ประกอบด้วย แบตเตอรี่ขนาด 9 โวลท์, สวิตช์ไฟฟ้า, เทปกาวพันสายไฟ, สายไฟ, แผงวงจรไฟฟ้า และท่อพีวีซี	25
ภาพที่ 5 วิธีการเตรียมตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสกับวัสดุที่เป็นส่วนประกอบของระเบิดแสงเครื่อง	26
ภาพที่ 6 แผนการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่ใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสกับหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง	27
ภาพที่ 7 แถบเปรียบเทียบระดับความเข้มของการเรืองแสงซึ่งมีทั้งหมด 5 ระดับ ตั้งแต่ระดับ 5 (เข้มที่สุด) จนถึงระดับ 1 (อ่อนที่สุด)	28
ภาพที่ 8 วิธีการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากพื้นผิววัสดุโดยใช้ไม้พันสำลี และการตัดปลายสำลีเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเรคพีซีอาร์	29
ภาพที่ 9 วิธีการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากพื้นผิววัสดุด้วยเทคนิค double swab และการตัดสำลีเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ	29
ภาพที่ 10 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสเมื่อสเปรย์ด้วยสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain, Diamond™ Nucleic Acid Dye, SYTOX® Green Nucleic Acid Stain, SYBR® Safe DNA Gel stain, EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain (EG) และ GelRed™ Nucleic Acid Stain เมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสงทางเลือกที่ความยาวคลื่นที่สารเรืองแสงแต่ละชนิดสามารถดูดกลืนได้	35

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
<p>ภาพที่ 11 กราฟแสดงระดับการเรืองแสงของสารเรืองแสงทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อจับกับดีเอ็นเอจากการสัมผัสนพื้นผิววัสดุ 3 ชนิด ได้แก่ ท่อพีวีซี เทปพันสายไฟ และแผงวงจรไฟฟ้า โดยที่ SG คือ SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain, DD คือ Diamond™ Nucleic Acid Dye, ST คือ SYTOX® Green Nucleic Acid Stain, SG คือ SYBR® Safe DNA Gel stain, EG คือ EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain และ GR คือ GelRed™ Nucleic Acid Stain (n=164)</p>	36
<p>ภาพที่ 12 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวนอัลลีลเฉลี่ย และความสูงพีคเฉลี่ยที่ได้รับจากตัวอย่างที่ใส่สารเรืองแสงลงในน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาตรต่างๆ ได้แก่ สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร (a), 1.5 ไมโครลิตร (b), 3.0 ไมโครลิตร (c) และสารเรืองแสงDiamond™ Nucleic Acid Dye ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร (d), 1.5 ไมโครลิตร (e) และ 3.0 ไมโครลิตร (f).</p>	39
<p>ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวนอัลลีลเฉลี่ย และความสูงพีคเฉลี่ยจากตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (SG) และ สารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye (DD)</p>	41
<p>ภาพที่ 14 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างที่มองเห็นการเรืองแสงในระดับต่างๆ ตั้งแต่ระดับ 1 เรืองแสงน้อยที่สุด จนถึงระดับ 5 เรืองแสงเข้มที่สุดโดยแบ่งออกตามระยะเวลาและอุณหภูมิที่เก็บรักษา</p>	42
<p>ภาพที่ 15 กราฟ (a) แสดงจำนวนอัลลีล และกราฟ (b) แสดงความสูงพีคที่ตรวจวัดได้จากเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสนระเบิดแสงเครื่องจำลอง โดยแบ่งออกตามชนิดของวัสดุและวิธีการตรวจพิสูจน์ DM แทนกระบวนการที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ และ CM แทนกระบวนการมาตรฐานของตำรวจ พิสูจน์หลักฐานเส้นสีดำแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูล</p>	44

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 16 กราฟแสดงการกระจายของความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลที่ได้รับจากกระบวนการที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้กับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน	45
ภาพที่ 17 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากกระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้กับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน โดยสีเข้มแสดงถึงอัลลีลที่แท้จริง (donor's allele) และสีอ่อนแสดงถึงอัลลีลปลอม (non-donor's allele)	46
ภาพที่ 18 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% ของความแตกต่างของจำนวนอัลลีลและความสูงพีคที่ได้รับจากตัวอย่างบริเวณที่เรืองแสงมากเปรียบเทียบกับบริเวณที่เรืองแสงน้อย โดยแบ่งออกตามชนิดของวัสดุ	47
ภาพที่ 19 กราฟแสดงการกระจายของความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลที่ได้รับจากกระบวนการที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้กับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน	48

รายการผลงานตีพิมพ์

1. Tonkrongjun, P., P. Thanakiatkrai, S. Phetpeng, W. Asawutmangkul, S. Sotthibandhu, and T. Kitpipit. 2017. "Touch DNA localization and direct PCR: An improved workflow for STR typing from improvise explosive devices." *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* no. 6:e610-e612.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.228>.
2. Tonkrongjun, P., S. Phetpeng, W. Asawutmangkul, S. Sotthibandhu, T. Kitpipit, and P. Thanakiatkrai. 2018. "Improved STR profiles from improvised explosive device (IED): fluorescence latent DNA detection and direct PCR." *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. Submitted.

List of permission



RightsLink®

Home

Account
Info

Help



Title: Touch DNA localization and direct PCR: An improved workflow for STR typing from improvise explosive devices

Author: P. Tonkrongjun, P. Thanakiatkrai, S. Phetpeng, W. Asawutmangkul, S. Sotthibandhu, T. Kitpipit

Publication: Forensic Science International: Genetics Supplement Series

Publisher: Elsevier

Date: December 2017

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Logged in as:
Premkamon Tonkrongjun
Account #:
3001361712

LOGOUT

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2018 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com



Copyright

Describes the rights related to the publication and distribution of research. It governs how authors (as well as their employers or funders), publishers and the wider general public can use, publish and distribute articles or books.

[Journal author rights](#)
[Government employees](#)
[Elsevier's rights](#)
[Protecting author rights](#)
[Open access](#)

Journal author rights

In order for Elsevier to publish and disseminate research articles, we need publishing rights. This is determined by a publishing agreement between the author and Elsevier. This agreement deals with the transfer or license of the copyright to Elsevier and authors retain significant rights to use and share their own published articles. Elsevier supports the need for authors to share, disseminate and maximize the impact of their research and these rights, in Elsevier proprietary journals* are defined below:

For subscription articles	For open access articles
<p>Authors transfer copyright to the publisher as part of a journal publishing agreement, but have the right to:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Share their article for Personal Use, Internal Institutional Use and Scholarly Sharing purposes, with a DOI link to the version of record on ScienceDirect (and with the Creative Commons CC-BY-NC-ND license for author manuscript versions) • Retain patent, trademark and other intellectual property rights (including research data). • Proper attribution and credit for the published work. 	<p>Authors sign an exclusive license agreement, where authors have copyright but license exclusive rights in their article to the publisher**. In this case authors have the right to:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Share their article in the same ways permitted to third parties under the relevant user license (together with Personal Use rights) so long as it contains a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the version of record on ScienceDirect. • Retain patent, trademark and other intellectual property rights (including research data). • Proper attribution and credit for the published work.

*Please note that society or third party owned journals may have different publishing agreements. Please see the journal's guide for authors for journal specific copyright information.

**This includes the right for the publisher to make and authorize commercial use, please see "[Rights granted to Elsevier](#)" for more details.

Help and Support

- Download a sample publishing agreement for subscription articles in [↓ English](#) and [↓ French](#).
- Download a sample publishing agreement for open access articles for authors choosing a [↓ commercial user license](#) and [↓ non-commercial user license](#).
- For authors who wish to self-archive see our [sharing guidelines](#)
- See our [author pages](#) for further details about how to promote your article.
- For use of Elsevier material not defined below please see our [permissions page](#) or [FAQs](#) [↗](#) or email us at the [✉ permissions help desk](#).

Government employees

Elsevier has specific publishing agreements with certain government and inter-governmental organizations for their employee authors. These agreements enable authors to retain substantially the same rights as detailed in the "[Author Rights section](#)" but are specifically tailored for employees from the relevant organizations, including:

- World Bank
- World Health Organization
- For US government employees, works created within the scope of their employment are considered to be public domain and Elsevier's publishing agreements do not require a transfer or license of rights for such works.
- In the UK and certain commonwealth countries, a work created by a government employee is copyrightable but the government may own the copyright (Crown copyright). [Click here](#) for information about UK government employees publishing open access

Rights granted to Elsevier

For both subscription and open access articles, published in proprietary titles, Elsevier is granted the following rights:

- The exclusive right to publish and distribute an article, and to grant rights to others, including for commercial purposes.
- For open access articles, Elsevier will apply the relevant third party [user license](#) where Elsevier publishes the article on its online platforms.
- The right to provide the article in all forms and media so the article can be used on the latest technology even after publication.
- The authority to enforce the rights in the article, on behalf of an author, against third parties, for example in the case of plagiarism or copyright infringement.

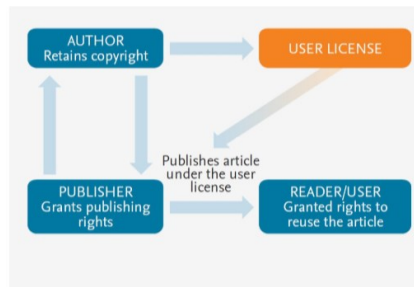
Protecting author rights

Copyright aims to protect the specific way the article has been written to describe an experiment and the results. Elsevier is committed to its authors to protect and defend their work and their reputation and takes allegations of infringement, plagiarism, ethic disputes and fraud very seriously.

If an author becomes aware of a possible plagiarism, fraud or infringement we recommend contacting their Elsevier publishing contact who can then liaise with our in-house legal department. Note that certain open access user licenses may permit quite [broad re-use](#) that might otherwise be counted as copyright infringement. For details about how to seek permission to use an article see our [permission page](#).

Open access

How copyright works with open access licenses



For Elsevier proprietary journals the following steps apply:

- 1 Authors sign a publishing agreement where they will have copyright but grant broad publishing and distribution rights to the publisher, including the right to publish the article on Elsevier's online platforms.
- 2 The author chooses an [end user license](#) under which readers can use and share the article.
- 3 The publisher makes the article available online with the author's choice of end user license.

Solutions



Researchers



About Elsevier



How can we help?



Select location/language



Global - English

Copyright © 2018 Elsevier, except certain content provided by third parties

Cookies are used by this site. To decline or learn more, visit our [Cookies](#) page.

[Terms and Conditions](#) [Privacy Policy](#) [Sitemap](#)



ELSEVIER

RELX Group™



บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ประเทศไทยเป็นประเทศอันดับ 2 ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเป็นอันดับที่ 16 ที่มีรายงานการก่อการร้ายมากที่สุดจากทั่วโลก [1] โดยพบการก่อเหตุมากที่สุดในพื้นที่จังหวัดชายแดนใต้ นำมาซึ่งความสูญเสียในชีวิตและทรัพย์สิน เศรษฐกิจ และความมั่นคงแห่งรัฐ [2] โดยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 จนถึงปัจจุบันรัฐบาลใช้งบประมาณในการแก้ปัญหาจำนวนมากถึง 290,910 ล้านบาท [3] จากสถิติจำนวนเหตุการณ์ความไม่สงบในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 พบว่ามีจำนวนผู้เสียชีวิตกว่า 6,544 ราย จากเหตุการณ์มากถึง 19,279 เหตุการณ์ ในจำนวนนี้เป็นเหตุระเบิดถึง 3,937 เหตุการณ์ ซึ่งมีสถิติมากเป็นอันดับสองรองจากเหตุการณ์ยิง [4] โดยเหตุระเบิดส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นมักเป็นระเบิดประเภทระเบิดแสวงเครื่อง (Improvised Explosive Devices, IEDs) ซึ่งเป็นกับระเบิดประเภทหนึ่งประกอบขึ้นจากวัสดุที่มีอยู่หรือหาได้ง่ายในท้องถิ่น วัสดุที่ใช้บรรจุมีหลากหลายทำให้ระเบิดแสวงเครื่องมีรูปแบบและลักษณะที่ไม่แน่นอน ง่ายต่อการซุกซ่อนพกพาและการนำมาใช้ วัตถุพยานที่ตรวจพบได้ภายหลังการระเบิดของระเบิดแสวงเครื่องประกอบด้วย เทปพันสายไฟ ลวดทองแดง แบตเตอรี่ นาฬิกาข้อมือ โทรศัพท์มือถือ และสิ่งห่อหุ้ม เช่น กระเป๋า ถังแก๊ส และท่อพีวีซี [5]

การประกอบและการขนย้ายระเบิดแสวงเครื่องด้วยมือเปล่าย่อมเกิดการหลุดลอกของเซลล์ผิวหนัง (epithelial cell) ผู้ก่อการร้ายติดอยู่บนวัสดุที่เป็นส่วนประกอบของระเบิดแสวงเครื่อง การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากหลักฐานดังกล่าวจึงมีโอกาสในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้ก่อการร้าย นำไปสู่การจับกุมและเข้าสู่กระบวนการยุติธรรมต่อไปได้ อย่างไรก็ตามการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานดังกล่าวมีรายงานอัตราความสำเร็จต่ำเพียงร้อยละ 7 สำหรับวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง [5] และร้อยละ 12 สำหรับระเบิดไปรษณีย์ภัณฑ์ [6] ในขณะที่ตัวอย่างระเบิดท่อไม่ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์เลย [7] เนื่องจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสมีปริมาณน้อยมาก [8] ถูกทำลายด้วยความร้อนจากแรงระเบิด รวมทั้งเซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัสไม่สามารถมองเห็นหรือระบุตำแหน่งบนหลักฐานได้ ทำให้ยากต่อการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์จากหลักฐานดังกล่าว

ส่งผลให้สูญเสียเวลาและงบประมาณอย่างมหาศาล รวมทั้งเสียโอกาสในการได้รับข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้ที่เกี่ยวข้องกับคดีก่อการร้ายจังหวัดชายแดนใต้ สำหรับเข้าสู่กระบวนการยุติธรรมต่อไป

เทคนิคไคเรคพีซีอาร์ (direct PCR) คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยไม่ผ่านการสกัด (DNA extraction) และการวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA quantification) จึงช่วยลดระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์ และลดค่าใช้จ่ายจากชุดน้ำยาสกัดและชุดน้ำยาวัดปริมาณดีเอ็นเอ อีกทั้งยังพบว่าคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับดีกว่าวิธีสกัดดีเอ็นเอแม้ในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อย [9] ทั้งนี้ เนื่องจากไม่สูญเสียดีเอ็นเอในระหว่างขั้นตอนการสกัด และชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สำหรับเทคนิคดังกล่าวสามารถทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้มากขึ้น [10] เทคนิคดังกล่าวเริ่มนำมาใช้ครั้งแรกในงานทางจุลชีววิทยา [10] และทางพฤกษศาสตร์ [11, 12] รวมถึงงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลักฐานทางชีวภาพหลายชนิด เช่น น้ำลาย [13], เลือด [14], อสุจิ [15], รากผม [15], รก [9], ชิ้นส่วนจากสัตว์ [16] และอาหาร [17, 18] นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และมีอัตราความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสูงในตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัสกับวัสดุหลายชนิด [19-21]

สารเรืองแสง (fluorophore) คือ สารประกอบชนิดหนึ่งซึ่งสามารถเรืองแสงได้เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยพลังงานในความยาวคลื่นเหมาะสม [22] สำหรับงานนิติพันธุศาสตร์มีการใช้สารเรืองแสงระบุตำแหน่งของวัตถุพยานชีวภาพบนหลักฐาน [23-25], ใช้วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ [26] ย้อมเซลล์ตัวอย่างชีวภาพต่าง ๆ เช่น น้ำลาย รากผม รวมทั้งมีการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงเพื่อระบุตำแหน่งของลายนิ้วมือ หรือเซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานและตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดังกล่าว [27-32] อย่างไรก็ตามงานวิจัยเหล่านี้ยังไม่ประสบความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจากวัตถุพยานที่เรืองแสง อีกทั้งไม่มีรายงานการทวนสอบเทคนิคและกระบวนการดังกล่าวในหลักฐานระเบิดแสงเครื่องจำลองมาก่อน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสงเครื่องทั้งระบบ ซึ่งรวมถึงการพัฒนาชุดน้ำยาสารเรืองแสงสำหรับระบุตำแหน่งของดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสและพัฒนากระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เรืองแสงนี้ด้วยเทคนิค

ไต่เร็ดพีซีอาร์ รวมทั้งศึกษาอายุการใช้งานและวิธีการเก็บรักษาชุดน้ำยาสารเรืองแสง นอกจากนี้ยังต้องการทวนสอบการใช้งานจริงของชุดน้ำยาและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นทั้งระบบในตัวอย่างระเบ็ดแสงเครื่องจำลอง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทั้งสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม และศูนย์พิสูจน์หลักฐานทั่วประเทศ

2. การตรวจเอกสาร

2.1 สถานการณ์ความไม่สงบในจังหวัดชายแดนภาคใต้ของประเทศไทย

สถานการณ์ความไม่สงบในจังหวัดชายแดนภาคใต้ของประเทศไทยมีจุดเริ่มต้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2491 จากเหตุการณ์การปะทะระหว่างเจ้าหน้าที่รัฐกับกลุ่มชาวไทยมุสลิมเชื้อสายมลายู ณ อำเภอจะนะะ จังหวัดนราธิวาส ต่อมาในปี พ.ศ. 2547 เกิดเหตุการณ์บานปลายอีกครั้งจากการปล้นปืนที่กองพันพัฒนาที่ 4 จังหวัดนราธิวาสโดยกลุ่มผู้ก่อการร้ายที่ต้องการแบ่งแยกดินแดน สถานการณ์ความรุนแรงในจังหวัดชายแดนภาคใต้ที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องด้วยรูปแบบต่างๆ ทั้งการบุกโจมตี ลอบวางระเบิด ลอบวางเพลิง ชุมนุมยิง และปล้นอาวุธจากฐานปฏิบัติการของรัฐ [2] จากสถิติจำนวนเหตุการณ์ความไม่สงบในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ถึง พ.ศ. 2560 พบว่าเกิดเหตุการณ์ทั้งสิ้น 19,279 เหตุการณ์ มีผู้เสียชีวิต 6,544 ราย และผู้ได้รับบาดเจ็บ 12,963 ราย ในจำนวนเหตุการณ์ทั้งหมดเป็นเหตุการณ์ระเบิดถึง 3,937 เหตุการณ์ คิดเป็นอันดับสองรองมาจากเหตุการณ์การยิง [4] โดยตั้งแต่ช่วงกลางปี พ.ศ. 2550 จนถึงปัจจุบัน มีการใช้วัตถุระเบิดแสวงเครื่องร่วมกับการชุมนุมโจมตีด้วยอาวุธเพิ่มมากขึ้น เหล่านี้ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ การท่องเที่ยว ชีวิตและความเป็นอยู่ของประชาชนในพื้นที่จังหวัดชายแดนใต้ ได้แก่ จังหวัดปัตตานี นราธิวาส ยะลา รวมทั้งอำเภอจะนะ อำเภอเทพา อำเภอนาทวี และอำเภอสะบ้าย้อยในจังหวัดสงขลา ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 จนถึงปัจจุบันรัฐบาลใช้งบประมาณในการแก้ปัญหาจำนวนทั้งสิ้น 290,901 ล้านบาท [3] สูญเสียอาวุธปืนจากเหตุการณ์ปล้นปืนรวมกว่า 2,004 กระบอก [33] อีกทั้งยังเกิดความเสียหายในสถานที่และทรัพย์สินทางราชการจำนวนมาก

2.2 ระเบิดแสวงเครื่อง

ระเบิดแสวงเครื่องเป็นรูปแบบหนึ่งของกับระเบิด ซึ่งเป็นการนำเอาวัสดุที่มีอยู่ในท้องถิ่นหรือวัสดุที่สามารถจัดหาได้ง่ายมาประกอบขึ้น ระเบิดแสวงเครื่องสามารถดัดแปลงได้หลายรูปแบบและไม่มีลักษณะที่แน่นอน ทำให้ง่ายสำหรับผู้ก่อการร้ายในการจัดหาวัตถุดิบ การซุกซ่อนพกพา การประดิษฐ์ และการนำมาใช้ แต่จะเป็นการยากสำหรับเจ้าหน้าที่ในการตรวจค้นและเก็บกู้ โดยผลของการระเบิดสามารถก่อให้เกิดอันตรายได้จากการกระแทกของแรงดันที่กระจายออกในทุกทิศทาง ความร้อน เปลวไฟ และที่สำคัญคือ สะเก็ดระเบิดที่เกิดจากภาชนะบรรจุ หรือเศษวัสดุที่เพิ่มเติมเข้าไปในตัวระเบิด [5]

ระเบิดแสวงเครื่องสามารถแบ่งประเภทตามระบบการทำงานได้ 3 ระบบ ได้แก่ ระบบสารเคมี ซึ่งเป็นการผสมสารเคมีหลายชนิด ทำให้เกิดปฏิกิริยากันแล้วเกิดการระเบิดขึ้น แต่ระบบนี้ไม่เป็นที่นิยมกันมากนักเพราะขั้นตอนการประดิษฐ์ยุ่งยากและไม่สามารถควบคุมเวลาที่จะให้เกิดการระเบิดได้แน่นอน เป็นอันตรายต่อผู้ประดิษฐ์ ระบบที่สอง คือ ระบบกลไก เป็นการใช้อุปกรณ์ทางกลไกหรือวัสดุใด ๆ มาทำให้วงจรของวงจรระเบิดทำงาน เช่น กลไกการกด-ยก เหมือนกับกลไกของกับระเบิด การดึง-ปล่อย เหมือนกับกลไกของลูกระเบิดขีว้าง และ การใช้กลไกลานนาฬิกา เป็นต้น และระบบสุดท้ายคือระบบไฟฟ้า เป็นการใช้อุปกรณ์ทางไฟฟ้า หรืออุปกรณ์ทางอิเล็กทรอนิกส์มาควบคุมการจุดระเบิด เช่น การใช้โทรศัพท์มือถือ เพจเจอร์ โทรศัพท์ไร้สาย รีโมทคอนโทรล และวิทยุบังคับ มาประกอบกับเชื้อประทุไฟฟ้า ระเบิดแสวงเครื่องรูปแบบนี้เป็นที่นิยมกันมากในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้ เนื่องจากประดิษฐ์ได้ง่าย สามารถกำหนดเวลาและควบคุมจังหวะการทำงานได้ สามารถควบคุมการทำงานได้ในระยะไกล และสามารถสร้างความซับซ้อนตอบสนองต่อวัตถุประสงค์ของผู้ประดิษฐ์ได้หลายรูปแบบ ตัวอย่างของระเบิดแสวงเครื่องที่พบเห็นได้บ่อยและใช้กันในปัจจุบัน เช่น ระเบิดที่ติดตั้งในรถยนต์ (car bomb) รถจักรยานยนต์ (motorcycle bomb) ไปรษณีย์ภัณฑ์ ท่อน้ำ กล้อง และ กระเป๋าคาด เป็นต้น [34]

2.3 ความรู้พื้นฐานทางนิติพันธุศาสตร์และกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอมนุษย์เป็นเครื่องมือหลักของงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ มีวัตถุประสงค์การวิเคราะห์เพื่อระบุเอกลักษณ์บุคคล หรือตรวจสอบความสัมพันธ์ของเครือญาติ จากวัตถุพยานชีวภาพทั้งจากสถานที่เกิดเหตุหรือผู้ต้องสงสัย โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ตำแหน่ง short tandem repeat (STR) ซึ่งเป็นส่วนของสารพันธุกรรมในนิวเคลียสที่ประกอบไปด้วยลำดับเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง มีขนาดของลำดับเบสแกนกลางจำนวนประมาณ 4-5 เบส จำนวนซ้ำของเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวมีความผันแปรระหว่างบุคคลสูง จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ร่วมกับการคำนวณทางสถิติเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล นอกจากนี้เครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวยังมีขนาดสั้นคือประมาณ 100-500 คู่เบส จึงเพิ่มโอกาสในการได้รับผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่เสื่อมสภาพ ในปัจจุบันมีการศึกษาและรายงานตำแหน่ง STR มากกว่า 20,000 ตำแหน่ง จากจำนวนทั้งหมดประมาณ 1 ล้านตำแหน่ง อย่างไรก็ตามมีเพียงประมาณ 20 ตำแหน่งเท่านั้นที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในงานนิติพันธุศาสตร์ ทั้งนี้สำนักงานสอบสวนกลาง (Federal Bureau of Investigation, FBI)

กำหนดตำแหน่ง STR มาตรฐานทั้งสิ้น 20 ตำแหน่ง เพื่อใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ในขณะที่เครือข่ายนิติพันธุศาสตร์แห่งสหภาพยุโรป (European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI) กำหนดตำแหน่ง STR มาตรฐานทั้งสิ้น 12 ตำแหน่งเพื่อใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ชุดตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงรวมตำแหน่ง STR มาตรฐานเหล่านี้และตำแหน่งยีนอะมีโลจีนิน (Amelogenin gene) สำหรับระบุเพศในการวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว ทำให้สะดวกต่อการวิเคราะห์ และผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องน่าเชื่อถือเนื่องจากอำนาจการจำแนกระหว่างบุคคลสูง [35]

สำหรับกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก คือ

- 1) การระบุตำแหน่งของวัตถุพยานชีวภาพบนหลักฐานด้วยการตาเปล่า หรือแหล่งกำเนิดแสงทางเลือก จากนั้นเก็บก๊อดีเอ็นเอจากหลักฐาน
- 2) สกัดดีเอ็นเอเพื่อคัดแยกและทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณและคุณภาพที่ดี ปราศจากสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ที่อาจยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์
- 3) วัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขั้นตอนก่อนหน้าด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real time PCR) เพื่อทราบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ สำหรับควบคุมคุณภาพและประเมินความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
- 4) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งเป้าหมายทั้งหมดในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และ
- 5) แยกและตรวจวัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มปริมาณขึ้น โดยใช้เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis) [36]

2.4 เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัส (touch DNA)

การสัมผัสวัตถุใดๆ จะทำให้เกิดการถ่ายโอนเซลล์และดีเอ็นเอจากผู้สัมผัสไปยังพื้นผิวของวัตถุนั้น [37] ดังนั้นเซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัส (touch DNA) ของผู้ก่อการร้ายที่สัมผัสลงบนวัสดุหลักฐานต่างๆ ทั้งจากการใช้ชีวิตประจำวัน การหยิบจับอาวุธ และการประกอบระเบิดแสวงเครื่อง จึงกลายเป็นวัตถุพยานสำคัญที่สามารถใช้ระบุเอกลักษณ์บุคคลของผู้สัมผัสและเชื่อมโยงกลับไปชี้ตัวผู้ก่อการร้ายได้ วัตถุพยานเซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัสนี้ถือเป็นวัตถุพยานที่ตรวจพบมากที่สุดในคดีก่อการร้าย และสามารถนำไปสู่การจับกุมผู้กระทำผิดเข้าสู่กระบวนการยุติธรรมได้บ่อยครั้ง อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราความสำเร็จของการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัสนี้มีเพียงแค่ประมาณร้อยละ 10 ของจำนวนหลักฐานทั้งหมดเท่านั้น [5, 7, 38] อีกทั้งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับมักมีคุณภาพต่ำ กล่าวคือ เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์หรือได้จำนวนอัลลีลเพียงบางส่วน ทำให้

ไม่สามารถใช้เชื่อมโยงกับผู้ต้องสงสัยหรือใช้ในชั้นศาลได้ ปัจจุบันการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานนั้นนิยมใช้สองวิธี ได้แก่ วิธีเทปยึด (tape lifting) และไม่สัมผัสพื้นปลายจุ่มสารละลายต่างๆ (swabbing) ซึ่งการเลือกใช้วิธีเก็บกู้ดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของหลักฐานแต่ละประเภท

2.5 เทคนิคไดเรคทีฟซีอาร์

เทคนิคไดเรคทีฟซีอาร์ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพโดยไม่ผ่านกระบวนการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ จึงสามารถลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ได้เนื่องจากละขั้นตอนการใช้ชุดน้ำยาจากทั้งสองกระบวนการดังกล่าว เทคนิคไดเรคทีฟซีอาร์ยังลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องจากขั้นตอนการสกัดที่มีความซับซ้อนและยุ่งยาก ใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยมากในการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งเพิ่มโอกาสและคุณภาพผลการวิเคราะห์มากขึ้นด้วย [39-42] เทคนิคดังกล่าวนี้เริ่มนำมาใช้ครั้งแรกในงานทางจุลชีววิทยา [43] และทางพิษศาสตร์ [12] สำหรับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์นั้น เทคนิคไดเรคทีฟซีอาร์ถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลักฐานทางชีวภาพหลายชนิดได้สำเร็จ เช่น น้ำลาย เลือด อสุจิ รากผม รก ชิ้นส่วนจากสัตว์ [9, 13, 14, 16, 44] รวมทั้งเซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัสบนวัสดุที่เป็นเสื้อผ้า กระดาษ พลาสติก กระสุนปืน สายไฟ แผงวงจรไฟฟ้า ถูขีปลือก เส้นใยเสื้อผ้า และตัวอย่างระเบิดแสวงเครื่องจำลอง [9, 19-21, 45, 46] ทั้งนี้ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคทีฟซีอาร์นี้เป็นผลมาจากหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น การปรับปรุงส่วนประกอบหลักที่สำคัญของปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือมีการเติมสารบางชนิดในสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น การใส่ bovine serum albumin (BSA) หรือการพัฒนาเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส เพื่อให้มีความทนทานต่อสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ปนเปื้อนมาพร้อมตัวอย่าง [13, 18, 47] เป็นต้น

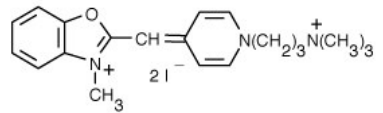
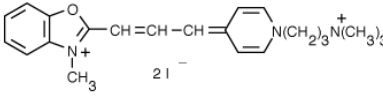
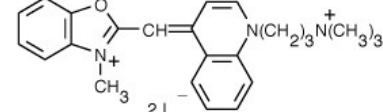
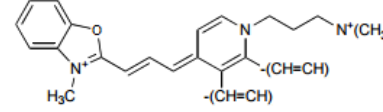
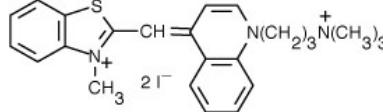
2.6 สารเรืองแสง

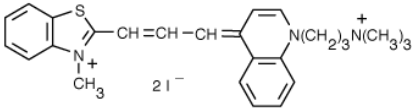
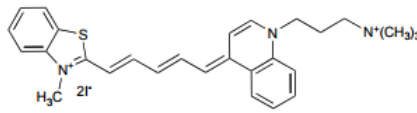
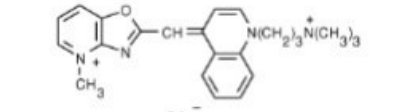
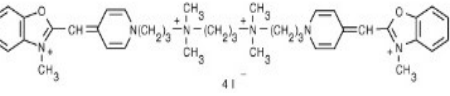
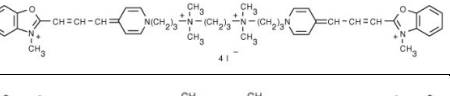
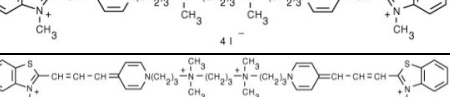
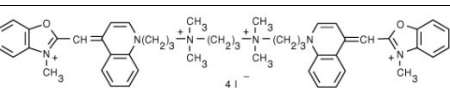
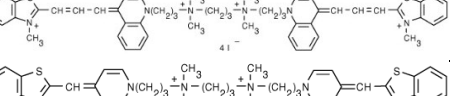
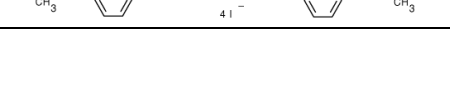

สารเรืองแสง คือสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยการรวมกันของสารกลุ่มอะโรมาติก (aromatic group) กับโมเลกุลที่มีโครงสร้างแบบระนาบ (plane) หรือแบบวง (cyclic) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) เมื่อสารเรืองแสงได้รับพลังงานในรูปของแสง อิเล็กตรอนในอะตอมของสารเรืองแสงจะถูกกระตุ้นไปสู่ภาวะเร้า (excited state) ทำให้เกิดความไม่เสถียร เมื่ออิเล็กตรอนกลับสู่ภาวะพื้น (ground state) จะคาย

พลังงานในรูปพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วงที่ตามองเห็น (visible light) ได้และไม่มีการคายความร้อน โดยพลังงานที่ถูกคายออกมานี้จะเป็นพลังงานที่มีความยาวคลื่นมากกว่าและมีปริมาณน้อยกว่าพลังงานแสงที่รับเข้าไป ทั้งนี้ความยาวคลื่นที่สามารถกระตุ้นสารเรืองแสงและความยาวคลื่นที่สารเรืองแสงปลดปล่อยออกมาจะแตกต่างกันไปในขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารเรืองแสงแต่ละชนิด [22] สารเรืองแสงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในหลายประเภท เช่น ใช้เป็นตัวตรวจจับการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของเหลวในการศึกษาทางเคมีและฟิสิกส์ [48], ใช้เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ในการศึกษาทางชีวเคมี [49] และใช้ติดฉลากดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อบอกปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ [36] สารเรืองแสงที่มีรายงานการใช้สำหรับงานชีววิทยาระดับโมเลกุลมีหลายชนิด ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 1

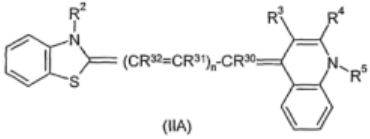
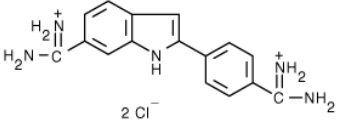
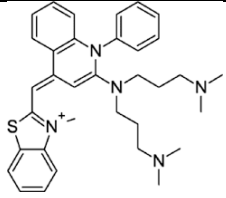
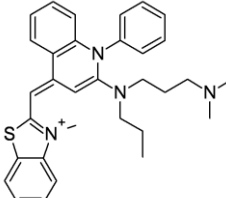
สารเรืองแสงมีกลไกการเข้าจับกับดีเอ็นเอหลายรูปแบบขึ้นกับชนิดของสารเรืองแสง ซึ่งประกอบด้วย กลไกการแทรกกลางระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอ (intercalating mechanism) โดยกลไกนี้เกิดขึ้นได้เนื่องจากดีเอ็นเอสายคู่คลายเกลียวออกในองศาที่ต่างกันตามชนิดของสารเรืองแสงเพื่อทำให้เบสคู่สมแยกออกจากกันและเกิดเป็นช่องว่าง ซึ่งสารเรืองแสงหรือโมเลกุลของสารที่มีรูปร่างเป็นวงแหวน (ring structure) และสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะสามารถเข้าจับได้ สารเรืองแสงที่มีกลไกการเข้าจับกับดีเอ็นเอในรูปแบบดังกล่าว ได้แก่ สารเรืองแสง Ethidium bromide, สารเรืองแสง SYBR® Safe DNA Gel stain และสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain เป็นต้น [50] สารเรืองแสงบางประเภทมีกลไกการเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณร่องเล็กของเกลียวดีเอ็นเอ (minor groove binding mechanism) ตรงตำแหน่งที่มีเบสอะดีนีนและไทมีนมาก สารเรืองแสงที่มีกลไกการเข้าจับกับดีเอ็นเอในรูปแบบดังกล่าว ได้แก่ สารเรืองแสง 4,6-diamidino-2-phenylindole หรือ DAPI [28] นอกจากนี้ยังมีกลไกการเข้าจับกับดีเอ็นเอรูปแบบอื่นๆ เช่น การอาศัยความเสถียรของขั้วไฟฟ้าโดยประจุบวกของ Thiazole group กับประจุลบที่หมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ (electrostatic interaction) ทั้งนี้กลไกการเข้าจับกับดีเอ็นเอแต่ละรูปแบบส่งผลต่อความไววิเคราะห์และความจำเพาะของการจับกับดีเอ็นเอ โดยพบว่าสารเรืองแสงที่สามารถจับกับดีเอ็นเอได้โดยอาศัยทั้งกลไกการแทรกกลางระหว่างคู่เบส และการอาศัยความเสถียรของขั้วไฟฟ้าจะสามารถเรืองแสงเพิ่มขึ้นเป็น 1,000 เท่าเมื่อจับกับดีเอ็นเอ ในขณะที่สารเรืองแสงประเภท DAPI จะเรืองแสงเพิ่มขึ้นเพียง 20 เท่า [28]

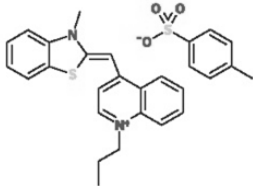
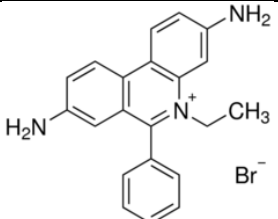
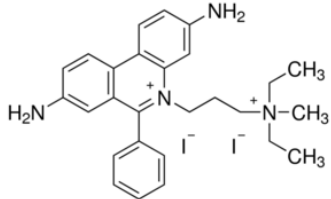
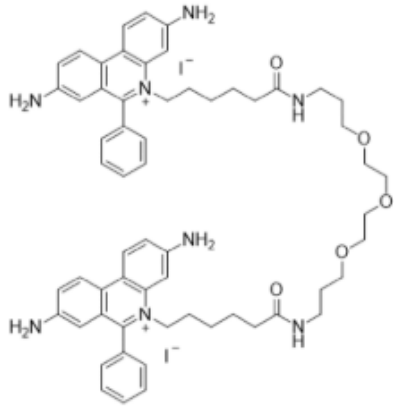
ตารางที่ 1 รายละเอียดของสารเรืองแสงที่มีรายงานการใช้สำหรับงานชีววิทยาระดับโมเลกุล

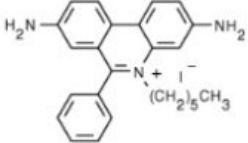
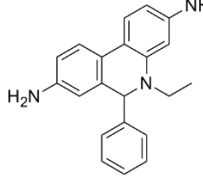
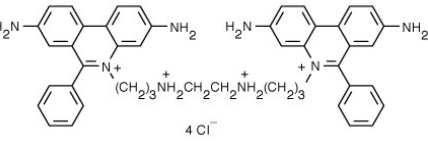
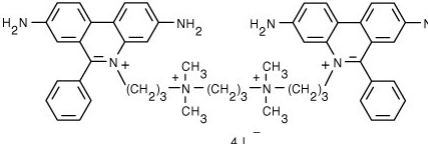
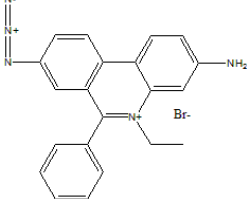
กลุ่ม	กลุ่มย่อย	ชื่อสารเคมี	โครงสร้างทางเคมี	กลไกในการจับดีเอ็นเอ	ความยาวคลื่นแสง (ดูด/คาย)	ค่าการเรืองแสง (QY)	การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์	ความเป็นพิษ/การก่อมะเร็ง	อ้างอิง
Cyanine	TO-PRO Family (monomer)	PO-PRO-1		Intercalation	435 / 455	0.39	No	ND	[51-53]
		PO-PRO-3		Intercalation	539 / 567	0.57	No	ND	[53, 54]
		YO-PRO-1		Intercalation	491 / 509	0.44	No	ND	[53, 54]
		YO-PRO-3		Intercalation	612 / 631	0.16	No	ND	[53, 54]
		TO-PRO-1		Intercalation	515 / 531	0.25	No	ND	[53, 54]

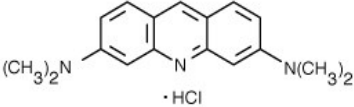
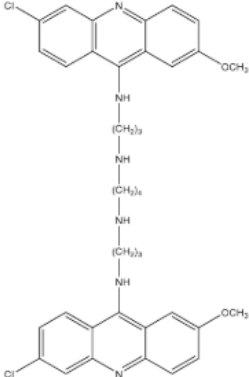
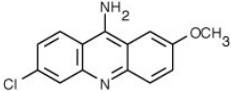
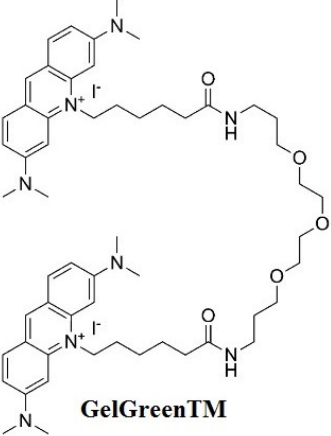
		TO-PRO-3		Intercalation	642 / 661	0.11	No	ND	[53, 54]
		TO-PRO-5		Intercalation	747 / 770	ND	No	ND	[53, 54]
		JO-PRO-1		Intercalation	530 / 546	0.38	No	ND	[53, 54]
	TOTO Family (dimer)	POPO-1		Intercalation	434 / 456	0.6	No	ND	[53, 54]
		POPO-3		Intercalation	534 / 570	0.46	No	ND	[53, 54]
		BOBO-1		Intercalation	462 / 481	0.22	No	ND	[53, 54]
		BOBO-3		Intercalation	570 / 602	0.39	No	ND	[53, 54]
		YOYO-1		Intercalation	489 / 509	0.52	No	ND	[53, 54]
		YOYO-3		Intercalation	612 / 631	0.15	No	ND	[53, 54]
		TOTO-1		Intercalation	514 / 533	0.34	No	ND	[53, 54]

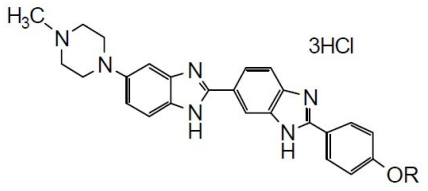
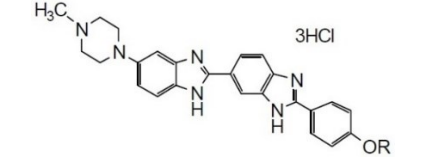
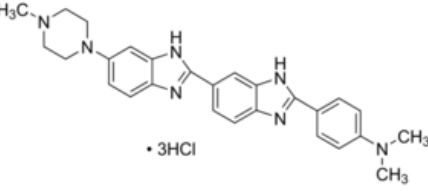
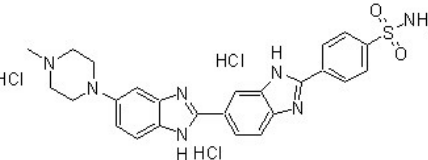
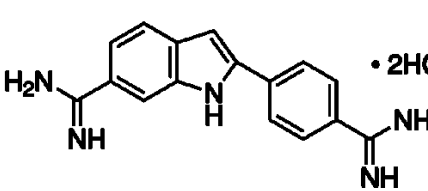
		TOTO-3		Intercalation	642 / 660	0.06	No	ND	[53, 54]
		JOJO-1		Intercalation	529 / 545	0.44	No	ND	[53, 54]
		LOLO-1		Intercalation	565 / 579	0.40	No	ND	[53, 54]
	SYTO	SYTO Blue (SYTO 40-45)	ND	Intercalation	420-455 / 441-484	ND	Yes	ND	[54, 55]
		SYTO Green (SYTO 9-16, 18, 20-25)	ND	Intercalation	485-521 / 498-556	0.08-0.76	Yes	ND	[54, 55]
		SYTO Orange (SYTO 80-86)	ND	Intercalation	528-567 / 544-583	ND	Yes	No / ND	[54, 55]

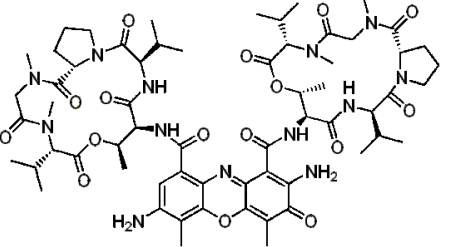
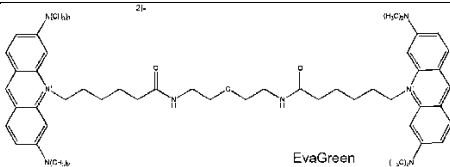
		SYTO Red (SYTO17, 59-64)		Intercalation	599-657 / 619-678	0.16-0.39	Yes	ND	[54-56]
	SYTOX	SYTOX Blue	ND	Intercalation	445 / 470	ND	No	ND	[54, 57]
		SYTOX Green		Intercalation, Electrostatic	504 / 523	0.53	No (live cell)	ND	[54, 58]
		SYTOX Orange	ND	Intercalation	547 / 570	0.9	No	ND	[54, 59]
		SYTOX Red	ND	Intercalation	640 / 658	ND	No	ND	[54, 60]
		Other	PicoGreen		Intercalation	502 / 523	0.53	No	ND
	SYBRGold		ND	Intercalation	495 / 537	0.6	0.66	ND	[54, 63, 64]
	SYBRGreen I			Intercalation, Electrostatic, Minorgroove binding	494 / 521	0.8	Yes	ND / No	[50, 54]

		SYBR Safe		Intercalation	502 / 530	>0.2	Yes	No / Very low	[54, 65]
Phenanthridine	Ethidium bromide		Intercalation	520 / 600	0.26	No	Yes / Yes (strong)	[50, 66]	
	Propidium iodide		Intercalation	535 / 617	0.13	No	Yes / Yes	[54, 63, 67]	
	GelRed		Intercalation	302 / 590	ND	No	No / No	[50]	

Hexidium iodide		Intercalation	518 / 600	ND	Yes	ND	[54, 67]
Dihydro-ethidium		Intercalation	518 / 605	ND	Yes	No / Yes	[67]
Ethidium homodimer-1 (EthD-1)		Intercalation	528 / 617	ND	No	ND	[54, 67]
Ethidium homodimer-2 (EthD-2)		Intercalation	535 / 624	ND	No	ND	[54, 67]
Ethidium Monoazide		Intercalation	520 / 600	0.75	No	Yes / Yes	[67-70]

Acridine	Acridine Orange		Intercalation, Electrostatic	500 / 525	0.15	Yes	Yes (weak) / ND	[67, 71, 72]
	Acridine Homodimer		Intercalation	431 / 498	ND	No	Yes / ND	[67]
	ACMA		Intercalation	419 / 483	0.6	ND	Yes / Yes	[13, 67, 73]
	GelGreen		Intercalation	500 / 530	ND	No	No	[50]

Indole and Imidazole	Bisbenzimidazole derivatives (Hoechst)	Hoechst 33342		Minor groove binding	350 / 461	0.38	Yes	ND / Yes	[63, 67]
		Hoechst 33258		Minor groove binding	352 / 461	0.42	Yes	ND / Yes	[63, 67]
		Hoechst 34580		Minor groove binding	392 / 440	ND	Yes	ND / Yes	[67]
		Hoechst S769121		Minor groove binding	355 / 495	ND	Yes	ND / Yes	[67]
	4,6-diamidino-2-phenylindole	DAPI		Intercalation, Minor groove binding	358 / 461	0.34	Weak	No / Yes	[74]

Other	7-AAD (7-Aminoactinomycin D)		Intercalation	546 / 647	0.05	Weakly	ND	[67, 75]
	RedSafe	ND	Unknown	309, 419, 514 / 537	ND	Yes	No	[50]
	Diamond™ Dye	ND	External binding	494 / 558	ND	Yes	Weak	[50]
	EvaGreen™		Intercalation	500 / 530	ND	No	Low / No	[76]

(QY คือ Quantum yield และ ND คือ ไม่มีข้อมูล)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การประยุกต์ใช้สารเรืองแสงในงานนิติพันธุศาสตร์

สารเรืองแสงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในหลายสาขาวิชาทั้งทางฟิสิกส์ [48] ชีวเคมี [49] รวมถึงในงานทางชีววิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุล [77] สำหรับงานด้านนิติพันธุศาสตร์หรือการประยุกต์ใช้ความรู้ทางพันธุศาสตร์เพื่อสืบค้นหาข้อเท็จจริงในคดีความนั้น สารเรืองแสงถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ในขั้นตอนการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหลักฐานก่อนการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ขั้นตอนดังกล่าวมีเป้าหมายเพื่อทราบปริมาณดีเอ็นเอมนุษย์ที่สกัดมาได้ สำหรับควบคุมคุณภาพและประเมินความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการติดฉลากสารเรืองแสงหรือโพรบเรืองแสงที่ไพร์เมอร์และกระตุ้นการเรืองแสงจากแหล่งกำเนิดแสงเพื่อช่วยในการตรวจวัดปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มขึ้นได้ ฉลากสีที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอมนุษย์ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ที่นิยมใช้ ได้แก่ Intercalating dye หรือ SYBR Green I [78], Molecular Beacon [79] และ Hydrolysis Probe ซึ่งมีกลไกการเรืองแสงที่แตกต่างกันและมีข้อดี-ข้อเสียเฉพาะตัว แต่อย่างไรก็ตามสำหรับการวัดปริมาณดีเอ็นเอมนุษย์ในงานนิติพันธุศาสตร์นั้นนิยมใช้ Hydrolysis Probe ที่มีชื่อเรียกทางการค้าว่า TaqMan เนื่องจากมีความถูกต้องแม่นยำสูง มีความไวในการวิเคราะห์สูง สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอของมนุษย์ในปริมาณน้อย และในช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่พบจากวัตถุพยานชีวภาพได้ รวมถึงสามารถตรวจวิเคราะห์ข้อบ่งชี้อื่นๆ เช่น การระบุเพศหรือการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอได้พร้อมกับการวัดปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาเดียว [80] ปัจจุบันมีการพัฒนาชุดตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอมนุษย์แบบสำเร็จรูปสำหรับใช้ในงานนิติพันธุศาสตร์ที่มีการทวนสอบการใช้งานตามมาตรฐานสากลเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์สำหรับหน่วยงานนิติพันธุศาสตร์ทั้งภาครัฐและเอกชนทั่วโลก [81, 82]

สารเรืองแสงยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาหรือระบุตำแหน่งร่องรอยของคราบเลือดบนวัตถุพยานบนหลักฐานหรือในสถานที่เกิดเหตุ ก่อนทำการเก็บวัตถุพยานดังกล่าวสำหรับนำไปตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุบุคคลที่เกี่ยวข้องกับคดีในเชิงลึกต่อไป ชุดน้ำยาสารเรืองแสงที่ใช้เพื่อวัตถุประสงค์นี้ได้แก่ น้ำยาลูมินอล (Luminol) [23] ฟลูออเรสซิน (Fluorescein) [24] และ บลูสตาร์ (BlueStar) [83] ทั้งนี้การตรวจหาร่องรอยคราบเลือดจากสารเรืองแสงดังกล่าวอาศัยหลักการเปล่งแสงของสารตั้งต้น (luminescence) ร่วมกับการ

เกิดปฏิกิริยาคลายกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase-like activity) สารเรืองแสงดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเปล่งแสงเมื่อได้รับพลังงานและต้องการกลับสู่สภาวะเสถียร โดยปกติจะปรากฏในรูปของเม็ด (tablet) หรือผง (powder) และต้องนำมาละลายในสารละลายต่างที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลักก่อนการนำไปใช้ทดสอบเลือด หากมีการปรากฏของเลือด ฮีมจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อให้เกิดโมเลกุลน้ำ ส่งผลให้สารเรืองแสงตั้งต้นถูกดึงอิเล็กตรอนไปใช้ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสดังกล่าวและเกิดเป็นอีกโมเลกุลซึ่งมีโครงสร้างที่ไม่เสถียร สารนี้จึงเกิดการคายพลังงานปรากฏในรูปของการเปล่งแสงขึ้นเพื่อให้โมเลกุลของสารตั้งต้นนั้นกลับมาอยู่ในสภาวะเสถียรอีกครั้ง น้ำยาลูมิโนลและฟลูออเรสซินไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ [84] ในขณะที่คราบเลือดที่ผ่านการตรวจสอบด้วยชุดน้ำยา BlueStar ในบางรายงานพบคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอลดลง และบางรายงานพบว่าคุณภาพไม่ลดลง [84, 85]

ในปี พ.ศ. 2552 พบรายงานการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงย้อมเซลล์รากผมในระยะเทโลเจน (telogen phase) ซึ่งเป็นระยะที่เส้นผมหยุดการเจริญเติบโตแต่ยังคงแต่ยังฝังตัวอยู่ในผิวหนัง จึงมักพบเป็นหลักฐานสำคัญในงานนิติวิทยาศาสตร์ งานวิจัยดังกล่าวสามารถเพิ่มอัตราความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากรากผมได้สำเร็จ โดยย้อมสีรากผมด้วยสารเรืองแสงชนิด 4,6-diamidino-2-phenylindole หรือ DAPI ซึ่งสามารถเข้าจับระหว่างเบส T และ A ของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่นประมาณ 372 นาโนเมตรจะเกิดการเรืองแสงสีฟ้า แสดงให้เห็นตำแหน่งของนิวเคลียสภายในเซลล์ [86] ต่อมาในปี พ.ศ. 2557 มีการพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากรากผมด้วยสารเรืองแสงดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยใช้เทคนิคการย้อมสีรากผมโดยตรงบนสไลด์กล้องจุลทรรศน์และนับจำนวนนิวเคลียสที่เรืองแสงก่อนการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งพบว่าการใช้นิวเคลียส เรืองแสงจำนวนมากว่า 50 นิวเคลียส จะให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ด้วยอัตราความสำเร็จร้อยละ 100 ในขณะที่ร้อยละ 96 ของรากผมที่ไม่ปรากฏการเรืองแสงของนิวเคลียสไม่ได้รับผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ [87] ภายหลังมีรายงานการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงชนิดอื่นๆในการย้อมสีรากผมก่อนตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เช่น SYBR® Green, Diamond™ Dye, GelGreen™, EvaGreen™ และ Redsafe™ [88] รวมทั้งมีการประยุกต์ใช้เทคนิคไทเรคทีฟซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากรากผมที่เรืองแสงดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่าสารเรืองแสงดังกล่าวสามารถใช้ย้อมสีเซลล์รากผมได้สำเร็จ

และพบอัตราความสำเร็จในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์หรือ High partial profile สูง อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้เทคนิคไจเร็ดพีซีอาร์จากเซลล์รากผมเรืองแสงนั้นมีอัตราความสำเร็จต่ำในรากผมระยะหยุดการเจริญเติบโต [27] นอกจากนี้มีการศึกษาระยะเวลาการเรืองแสงจากเซลล์รากผม โดยพบว่าสารเรืองแสง SYBR® Green และ Diamond™ มีระยะเวลาการเรืองแสงประมาณ 7 วันและ 1 เดือนตามลำดับ [89]

ต่อมาได้มีการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสเพื่อระบุตำแหน่งของลายนิ้วมือบนหลักฐาน โดยใช้ร่วมกับการใช้แหล่งกำเนิดแสงทางเลือกรูปแบบต่าง ๆ [28] โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบสารเรืองแสง 6 ชนิด (SYBR® Green, Diamond™ Dye, GelGreen™, GelRed™, EvaGreen™ และ RedSafe™) ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับวัตถุประสงค์ดังกล่าว รวมทั้งศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสงนี้ต่อการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในขั้นตอนต่างๆ ทั้งการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลการศึกษาพบว่าสารเรืองแสงชนิด SYBR® Green ปรากฏความเข้มข้นของการเรืองแสงมากที่สุดเมื่อเข้าจับกับลายนิ้วมือ [32] แต่พบว่าเกิดความล้มเหลวในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากลายนิ้วมือที่มีการเรืองแสงจากสารเรืองแสงชนิด SYBR® Green นี้ [90] เนื่องจากสารเรืองแสง SYBR® Green ส่งผลกระทบในด้านลบต่อกลไกการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ตัวกรองซิลิกา ในขณะที่สารเรืองแสงชนิด GelGreen™ ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แต่ไม่เหมาะสมนำมาใช้สำหรับตรวจหาลายนิ้วมือเนื่องจากความเข้มข้นของการเรืองแสงต่ำ [50, 90] งานวิจัยดังกล่าวนี้จึงยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในงานนิติพันธุศาสตร์ ต่อมาในปี พ.ศ. 2561 กลุ่มวิจัยเดิมนี้ใช้สารเรืองแสง Diamond™ Dye ศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยดีเอ็นเอของแต่ละบุคคล (shedder status) บนพื้นผิววัสดุกระจกสไลด์ [30] และพบว่าสารเรืองแสง Diamond™ Dye สามารถใช้แยกบริเวณที่อาสาสมัครเคยสัมผัสและไม่เคยสัมผัสได้อย่างชัดเจน โดยผลการศึกษาสอดคล้องกับการทดลองเดียวกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ [29]

3. วัตถุประสงค์

3.1 เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง 3 ชนิด ได้แก่ ท่อพีวีซี เทปกาวพันสายไฟ และแผงวงจรไฟฟ้า

3.2 เพื่อศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสงที่เลือกใช้ ต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับ

3.3 เพื่อศึกษาอายุการใช้งานและวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับชุดน้ำยาสารเรืองแสงที่พัฒนาขึ้น

3.4 เพื่อทวนสอบการใช้งานจริงของชุดน้ำยาสารเรืองแสงและกระบวนการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเรคทีฟซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในตัวอย่างระเบิดแสวงเครื่องจำลอง (mock casework sample)

3.5 เพื่อเปรียบเทียบความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างระเบิดแสวงเครื่องจำลองด้วยกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน

บทที่ 2

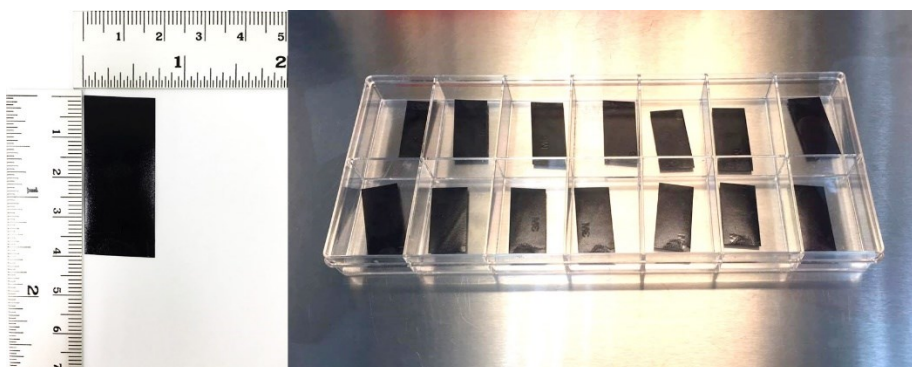
วิธีการวิจัย

1. การเตรียมวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการทดลองโดยใช้วัสดุอุปกรณ์ที่เป็นส่วนประกอบของระเบิดแสวงเครื่องที่พบได้บ่อยในพื้นที่จังหวัดชายแดนใต้จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เทปกาวพันสายไฟ ยี่ห้อ 3M แผงวงจรไฟฟ้า และท่อพีวีซี รวมทั้งวัสดุต่างๆ สำหรับใช้ในการทดลองประกอบระเบิดแสวงเครื่องจำลอง โดยก่อนทดลองจะนำวัสดุแต่ละชนิดมาทำความสะอาดเพื่อให้ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน ดังนี้

1.1 เทปกาวพันสายไฟ ยี่ห้อ 3M

ตัดเทปกาวพันสายไฟให้เป็นชิ้นเล็กๆ ความยาวประมาณชิ้นละ 4 เซนติเมตร นำมาวางให้ด้านเหนียวหงายขึ้นภายใต้รังสียูวีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนอยู่บนวัสดุเสื่อมสภาพ ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 วิธีการเตรียมวัสดุเทปกาวพันสายไฟโดยการวางภายใต้รังสียูวี

1.2 แผงวงจรไฟฟ้า

ล้างแผงวงจรไฟฟ้าขนาดประมาณ 2.5X3 เซนติเมตร ด้วยน้ำยาล้างจานเพื่อขจัดคราบสกปรก จากนั้นแช่ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Clorox) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วขัดทำความสะอาด เพื่อทำลายและชะล้างดีเอ็นเอที่อาจ

ปนเปื้อนอยู่ออกจากนั้นวางภายใต้รังสียูวีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเออื่นที่อาจหลงเหลืออยู่บนวัสดุเสียหายก่อนนำมาใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วิธีการเตรียมวัสดุแผงวงจรไฟฟ้าโดยการล้างในน้ำยาล้างจาน สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์และการวางภายใต้รังสียูวี

1.3 ท่อพีวีซี

ตัดท่อพีวีซีให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 3X5 เซนติเมตร ก่อนล้างด้วยน้ำยาล้างจานเพื่อขจัดคราบสกปรก จากนั้นแช่ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วขัดทำความสะอาด และวางภายใต้รังสียูวีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เช่นเดียวกับวัสดุแผงวงจรไฟฟ้า (ภาพที่ 3)

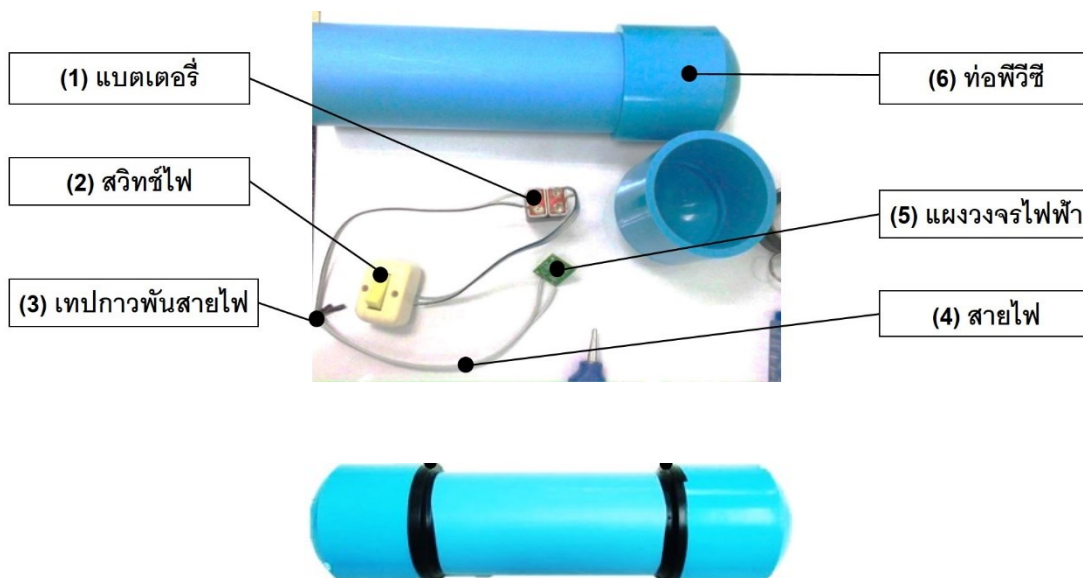


ภาพที่ 3 วิธีการเตรียมวัสดุท่อพีวีซีโดยการล้างในน้ำยาล้างจาน สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์และการวางภายใต้รังสียูวี

1.4 วัสดุประกอบระเบิดแสงเครื่องจำลอง

ระเบิดแสงเครื่องจำลองที่เลือกใช้ในการทดลองนี้เป็นระเบิดแสงเครื่องระบบไฟฟ้า ซึ่งเป็นการใช้อุปกรณ์ทางอิเล็กทรอนิกส์สำหรับควบคุมการจุดชนวนระเบิดและเป็นลักษณะของระเบิดแสงเครื่องที่พบบ่อยในคดีก่อการร้ายจังหวัดชายแดนภาคใต้ของไทย เนื่องจากสามารถประดิษฐ์ได้ง่ายและสามารถกำหนดเวลาการทำงานได้ โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้วัสดุที่พบได้บ่อยในคดีดังกล่าวสำหรับการทดลอง อย่างไรก็ตามเพื่อความปลอดภัยในการทดลอง แฉวงจรไฟฟ้าที่ใช้จะไม่มีวงจรสำหรับจุดระเบิดจริง รวมถึงไม่ได้บรรจุดินระเบิดเข้าไปในตัวระเบิดจำลองนี้ด้วย ซึ่งวัสดุที่ใช้เป็นส่วนประกอบของระเบิดแสงเครื่องจำลองในการทดลองนี้มีทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ 1) แบตเตอรี่ขนาด 9 โวลต์ 2) สวิตช์ไฟพลาสติก 3) เทปกาวพันสายไฟยี่ห้อ 3M 4) สายไฟ 5) แฉวงจรไฟฟ้า และ 6) ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 นิ้ว ความยาว 40 เซนติเมตร พร้อมฝาปิดท่อ 2 ข้าง วัสดุทั้งหมดจะถูกทำความสะอาดให้ปราศจากดีเอ็นเอด้วยการล้างในน้ำยาไฮโปคลอไรต์และวางภายใต้รังสียูวีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปให้อาสาสมัครประกอบระเบิดแสงเครื่องจำลอง

การประกอบระเบิดแสงเครื่องจำลอง เริ่มต้นจากการชี้แจงและทำความเข้าใจกับอาสาสมัครจำนวน 5 คน เกี่ยวกับขั้นตอนการประกอบระเบิดแสงเครื่องอย่างละเอียด พร้อมทั้งทดลองประกอบระเบิดให้เกิดความคุ้นเคย ก่อนประกอบระเบิดแสงเครื่องที่จะใช้ในการทดลอง โดยให้อาสาสมัครล้างมือด้วยสบู่แล้วทำกิจวัตรประจำวันตามปกติเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นการสวมถุงมือ แล้วจึงลงมือประกอบระเบิดแสงเครื่องจำลองด้วยแรงสัมผัสและท่าทางที่อาสาสมัครนัดตามปกติ จำนวน 2 ชุด โดยเว้นช่วงเวลาในการประกอบระเบิดแต่ละชุดห่างกันอย่างน้อย 24 ชั่วโมง การประกอบระเบิดเริ่มจากใช้เทปกาวพันแบตเตอรี่ 2 ก้อนเข้าด้วยกัน จากนั้นต่อสายไฟจากขั้วของแบตเตอรี่ 2 สาย สายแรกต่อเข้ากับสวิตช์ไฟ และสายที่สองต่อกับสายไฟอีกเส้นหนึ่งแล้วพันมดด้วยเทปกาว จากนั้นนำปลายสายไฟเส้นสุดท้ายไปต่อเข้ากับแฉวงจรไฟฟ้า หลังจากต่อวงจรทั้งหมดเสร็จสิ้น วัสดุทั้งหมดจะถูกบรรจุลงในท่อพีวีซีปิดฝาทั้งสองข้างของท่อพีวีซีแล้วพันปิดด้วยเทปกาวพันบริเวณรอยต่อ รูปแบบระเบิดแสงเครื่องจำลองแสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 วัสดุที่ใช้ในการประกอบระเบิดแสงเครื่องจำลอง ประกอบด้วย (1) แบตเตอรี่ขนาด 9 โวลต์ (2) สวิตช์ไฟฟ้า (3) เทปกาวพันสายไฟ (4) สายไฟ (5) แผงวงจรไฟฟ้า และ (6) ท่อพีวีซี

2. การเตรียมตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสกับวัสดุระเบิดแสงเครื่อง

คัดเลือกอาสาสมัครจำนวน 10 คน ทั้งเพศชายและหญิงที่มีอายุ 20-40 ปี และเป็นผู้ที่สุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์เข้าร่วมการทดลอง จากนั้นให้อาสาสมัครทุกคนล้างมือด้วยสบู่แล้วทำกิจวัตรประจำวันตามปกติเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นการสวมถุงมือ เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้อาสาสมัครสัมผัสวัสดุทดลองโดยใช้นิ้วหัวแม่มือกดลงบนวัสดุที่เตรียมไว้ดังอธิบายข้างต้นด้วยแรงสัมผัสปกติ พร้อมทั้งขยับนิ้วสัมผัสวัสดุเป็นเวลาประมาณ 1 นาที ดังแสดงในภาพที่ 5 ก่อนจะนำวัสดุทดลองเหล่านี้ไปใช้ศึกษาในขั้นตอนถัดไป

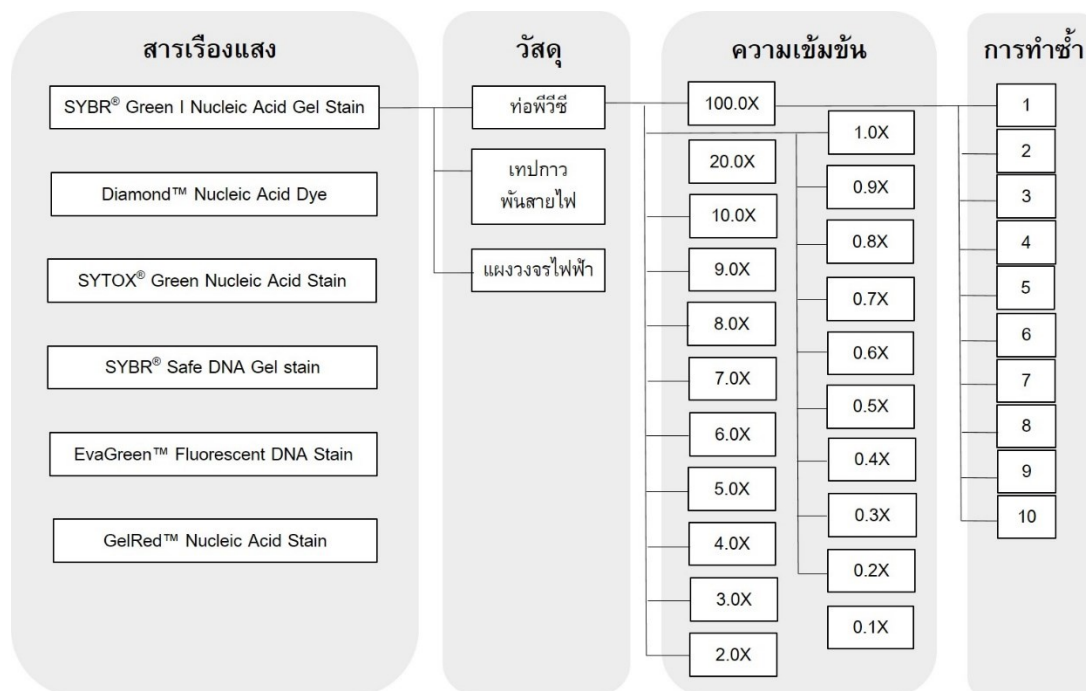
ทั้งนี้งานวิจัยนี้ได้ใช้ตัวอย่างที่เป็นสารคัดหลั่งจากมนุษย์ ซึ่งได้แก่เยื่อบุกระพุ้งแก้ม และเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัส ดังนั้นจึงได้ดำเนินการขออนุมัติจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยยึดหลักจริยธรรมของประเทศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) และแนวทางการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี (The International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice) โดยมีเอกสารอนุมัติรหัสโครงการ HSc-HREC-61-005-02-1



ภาพที่ 5 วิธีการเตรียมตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสวัสดุที่เป็นส่วนประกอบของระเบิดแสงเครื่อง

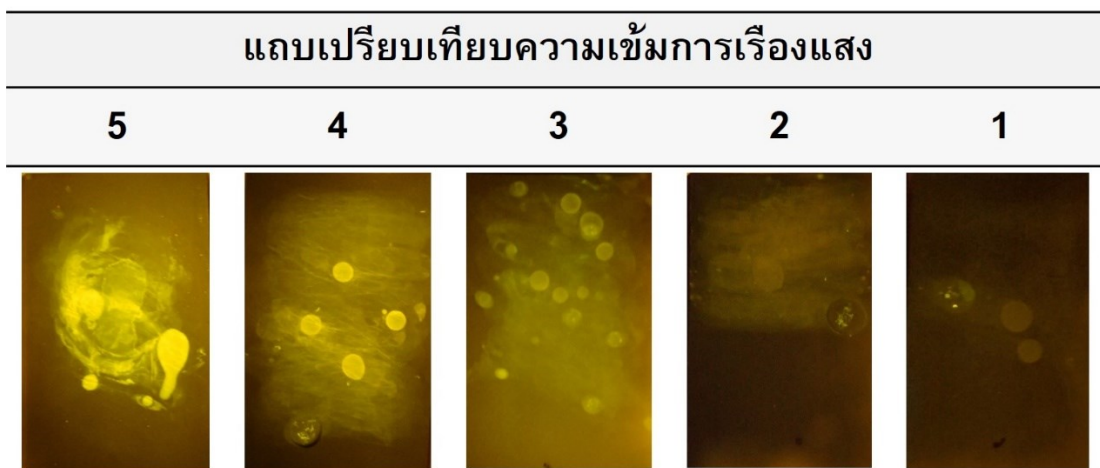
3. การเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารเรืองแสงสำหรับใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง

การศึกษานี้ทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเรืองแสงแต่ละชนิดสำหรับตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, California, USA), Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, Wisconsin, USA), SYTOX® Green Nucleic Acid Stain (Thermo Fisher Scientific, California, USA), SYBR® Safe DNA Gel stain (Invitrogen), EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain (Biotium, California, USA) และ GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium) โดยมีเกณฑ์ในการเลือกดังนี้คือ 1) เป็นสารที่สามารถจับกับดีเอ็นเอแล้วให้การเรืองแสงเมื่อส่องผ่านแสงทางเลือก (external light source) ได้ 2) มีรายงานการนำมาใช้ตรวจหาดีเอ็นเอได้สำเร็จและมีประสิทธิภาพดี 3) มีความเป็นพิษต่ำและปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน โดยในการทดลองนี้ได้เจือจาง สารเรืองแสงด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1X-100X ก่อนจะบรรจุสารเรืองแสงที่เจือจางแล้วลงในขวดสเปรย์ขนาด 50 มิลลิลิตร และฉีดพ่นลงบนวัสดุหลักฐานระเบิดที่ผ่านการสัมผัสจากอาสาสมัคร จากนั้นตรวจหาการเรืองแสงโดยใช้พลังงานกระตุ้นจากเครื่องกำเนิดแสงทางเลือกโพลีไลท์ (Rofin Polilight PL-500) ที่ความยาวคลื่น 302-505 นาโนเมตร แล้วจึงถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิทัล (OLYMPUS TG-850) ผ่านแว่นกรองความยาวคลื่นแสง จากนั้นประเมินความเข้มของการเรืองแสงที่สังเกตได้ โดยทำการทดลองทั้งหมดซ้ำจำนวน 10 ครั้งในแต่ละชุดการทดลอง จากอาสาสมัคร 10 คน ภาพรวมของการทดลองนี้แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แผนการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่ใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง

ทั้งนี้เพื่อเป็นการควบคุมการทดลองให้เป็นมาตรฐานเดียวกันทั้งงานวิจัย จึงสร้างแถบเปรียบเทียบความเข้มของการเรืองแสงขึ้นในงานวิจัยนี้ เพื่อใช้ประเมินและให้คะแนนความเข้มของการเรืองแสงที่สังเกตได้จากการทดลอง โดยใช้น้ำยาสารเรืองแสงชนิดฟอสฟอรัสดีเอ็นเอเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อประเมินความเข้มของการเรืองแสงที่มากที่สุดและน้อยที่สุด จากนั้นถ่ายรูปการเรืองแสงโดยควบคุมแสงจากภายนอก แล้วให้คะแนนความเข้มของการเรืองแสง โดยที่ระดับ 5 แสดงถึงการเรืองแสงที่เข้มที่สุด แล้วลดลงตามลำดับจนถึงระดับ 1 ซึ่งแสดงถึงความเข้มในการเรืองแสงน้อยที่สุด แถบเปรียบเทียบความเข้มของการเรืองแสงแสดงดังภาพที่ 7 ก่อนจะนำภาพถ่ายของตัวอย่างมาประเมิน และให้คะแนนความเข้มของการเรืองแสง

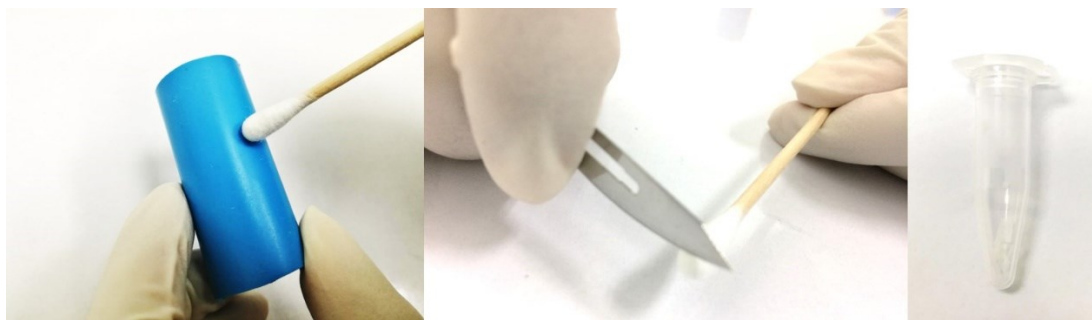


ภาพที่ 7 แถบเปรียบเทียบระดับความเข้มของการเรืองแสงซึ่งมีทั้งหมด 5 ระดับ ตั้งแต่ระดับ 5 (เข้มที่สุด) จนถึงระดับ 1 (อ่อนที่สุด)

4. การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัส

งานวิจัยนี้ทำการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสจำนวน 2 รูปแบบ คือ 1) การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัสที่ผ่านการใช้ชุดน้ำยาสารเรืองแสง และกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ และ 2) การเก็บกู้ดีเอ็นเอตามกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน ซึ่งเป็นรูปแบบที่ใช้สำหรับการทดลองเปรียบเทียบความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสที่เรืองแสงบนวัสดุหลักฐาน ระเบิดแสวงเครื่องเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเร็คพีซีอาร์ จะใช้ไม้พันสำลี (Thai Gauze, Bangkok, Thailand) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวโดยให้ปลายสำลีตั้งฉากกับวัสดุและ ฎูไปมาบนตำแหน่งที่มองเห็นการเรืองแสงซึ่งเป็นตำแหน่งที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอ ก่อนจะตัด ชิ้นส่วนปลายสำลีที่ติดสารเรืองแสงขนาดประมาณ 1X1 มิลลิเมตร ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสแสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 วิธีการเก็บตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากพื้นผิววัสดุโดยใช้ไม้พันสำลี และการตัดปลายสำลีเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเร็กซ์ชีอาร์

การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง ด้วยกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ จะใช้ไม้พันสำลีชนิดเดียวกันเก็บตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสด้วยวิธี double swab กล่าวคือ เช็ดตำแหน่งที่คาดว่าจะปรากฏดีเอ็นเอด้วยไม้พันสำลีที่ชุบด้วยน้ำกลั่นทั่วพื้นผิววัสดุและให้หัวสำลีสัมผัสในทุกทิศทาง จากนั้นตามด้วยการเช็ดบริเวณดังกล่าวด้วยไม้พันสำลีแห้งอีกครั้งหนึ่ง สำลีที่พันปลายไม้ทั้งหมดจะถูกตัดออกและใส่รวมลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 9 เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 9 วิธีการเก็บตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากพื้นผิววัสดุด้วยเทคนิค double swab และการตัดสำลีเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ

5. การสกัดดีเอ็นเอ

งานวิจัยนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอในการทดลองด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ด้วยชุดน้ำยา QIAamp® DNA Investigator kit (Qiagen, Hilden, Germany) ตามคู่มือปฏิบัติการ โดยการเติม proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ buffer ATL ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร ที่บรรจุสำลีพันปลายที่คาดว่ามิเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสติดอยู่ ก่อนจะนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 56°C พร้อมเขย่าอัตโนมัติด้วยความเร็ว 900 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติม buffer AL ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 70°C พร้อมเขย่าอัตโนมัติด้วยความเร็ว 900 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 96 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีก 15 วินาที แล้วทำการถ่ายเทสารละลายที่ได้ลงในคอลัมน์ซึ่งอยู่ในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตรหลอดใหม่ นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม buffer AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตรหลอดใหม่อีกครั้ง เติม buffer AW2 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที ก่อนจะย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วเติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 96 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3 นาที ก่อนจะบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงย้ายคอลัมน์มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม buffer ATE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอสกัดในหลอดทดลองดังกล่าว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนจะนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

6. การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอสกัดจะถูกนำมาวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific) โดยการเติมน้ำยา Quantifiler® PCR Reaction mix ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร และ Primer mix ปริมาตร 10.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 23 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอสกัด ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอด แล้วใส่ในเครื่อง Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems โดยตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ด้วยการเปรียบเทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นด้วยการเจือจางดีเอ็นเอควบคุมอย่างเป็นลำดับส่วน (serial dilution) ตั้งแต่ความเข้มข้น 50 ถึง 0.0122 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งจะถูกใส่เข้าไปในเครื่องมือเพื่อตรวจวิเคราะห์พร้อมกันกับตัวอย่างทุกครั้ง ตามที่ระบุในคู่มือของชุดน้ำยา

7. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอสกัดและจากตัวอย่างชีวภาพ โดยตรงใช้ชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification (Thermo Fisher Scientific) ปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย น้ำยา Identifiler® Plus Master mix ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร, Primer set ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอสกัดปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร หรือตัวอย่างดีเอ็นเอในก้อนสำหรับเทคนิคไดเรคพีซีอาร์ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง T100™ Bio-Rad thermal cycler ตามสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่แนะนำในคู่มือปฏิบัติการ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial incubation	95	11	1
Denaturation	94	20	1
Annealing/Extension	59	180	32
Final extension	60	600	
Final hold	4	∞	1

8. การแยกและตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตรเข้ากับ Hi-Di formamide ปริมาตร 24.5 ไมโครลิตร และ GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่แข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer ใช้แคปิลลารีความยาว 47 เซนติเมตร บรรจุพอลิเมอร์ชนิด POP-4® คำสั่งปฏิบัติการ (module) GS STR POP4 (1mL) G5v2 ฉีดตัวอย่างด้วยกระแสไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 วินาที และแยกตัวอย่างด้วยกระแสไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 27 นาที ตามคู่มือปฏิบัติการ

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลดิบที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลด้วยซอฟต์แวร์ GeneMapper® เวอร์ชัน 3.2 โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ Analysis method: Identifiler_Plus_AnalysisMethod_v1, Panel: Identifiler_Plus_Panels_v1, Size standard: GS500(-250) LIZ และ Instrument type: ABI 310 โดยกำหนด Analytical threshold ที่ 100 rfu และ Stochastic threshold ที่ 200 rfu จากนั้นนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาศึกษาจำนวนอัลลีล ความสูงพีค ผลบวกปลอม และรูปแบบผลกระทบจากตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์

นอกจากนี้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการศึกษาการทวนสอบกับตัวอย่างระเบิด แสงเครื่องจำลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยทำการเปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่ได้รับจากกลุ่มตัวอย่างระเบิดแสงเครื่องจำลองที่ใช้สารเรืองแสงและเทคนิคไดเรคท์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น กับกลุ่มตัวอย่างที่ใช้กระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอตามมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐาน ด้วยการวิเคราะห์ช่วงความน่าเชื่อถือที่ 95 เปอร์เซ็นต์ของ Bayesian โดยใช้หลักสถิติ Bayesian estimation supersedes the t-test (BEST) ด้วยโปรแกรมอัตโนมัติในเว็บไซต์ www.sumsar.net เพื่อให้โปรแกรมทำการสุ่มข้อมูลจำนวน 20,000 ซ้ำ เพื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

ของข้อมูลจากสองวิธี ทั้งนี้หากช่วงความน่าเชื่อถือที่ 95 เปอร์เซนต์ของข้อมูลทั้งสองกลุ่มไม่
ซ้อนทับกันแสดงว่าข้อมูลสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3

ผลการทดลอง

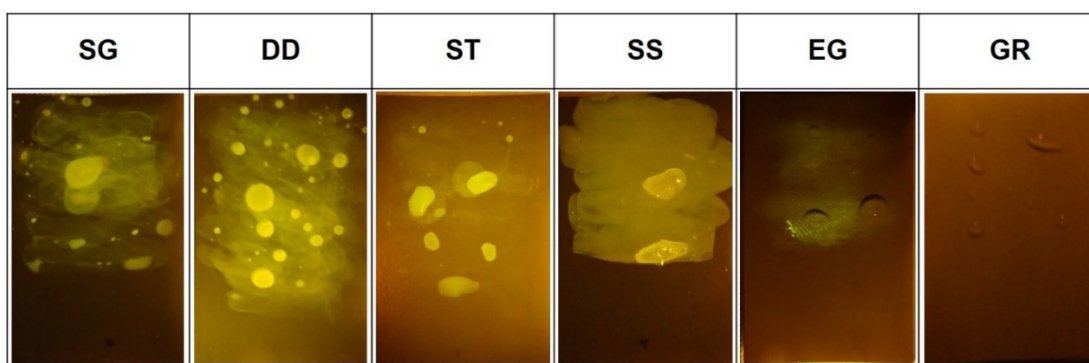
ผลการทดลองของงานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ได้แก่ 1) ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารเรืองแสงสำหรับใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง 2) ผลการศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสงต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3) ผลการศึกษาอายุการใช้งานและวิธีการเก็บรักษาสารเรืองแสงที่พัฒนาขึ้น และ 4) การทวนสอบการใช้งานจริงของชุดน้ำยาสารเรืองแสงร่วมกับกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอแบบไดเรคทีฟซีอาร์กับตัวอย่างระเบิดแสงเครื่องจำลอง

1. ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารเรืองแสงสำหรับใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความเหมาะสมในการใช้งานของสารเรืองแสง (DNA binding dye) เพื่อให้ได้สารเรืองแสงและความเข้มข้นที่ดีที่สุดสำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารเรืองแสงทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen), Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega), SYTOX® Green Nucleic Acid Stain (Thermo Fisher Scientific), SYBR® Safe DNA Gel stain (Invitrogen), EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain (Biotium) และ GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium) ในการทดลองนี้จะนำสารเรืองแสงทั้งหมดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจำนวน 21 ความเข้มข้น ในช่วง 0.1X-100X จากนั้นนำสารเรืองแสงแต่ละความเข้มข้นไปฉีดพ่นลงบนวัสดุที่ผ่านการสัมผัสโดยอาสาสมัคร แล้วจึงนำไปส่องหาการเรืองแสงภายใต้การกระตุ้นด้วยพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่นต่างๆที่สารเรืองแสงแต่ละชนิดดูดกลืนได้และมองผ่านแว่นกรองความยาวคลื่นในห้องมืดเพื่อป้องกันการรบกวนของแสงจากภายนอก แล้วประเมินความเข้มของการเรืองแสงด้วยแถบเปรียบเทียบความเข้มแสงที่พัฒนาขึ้นโดยให้ระดับคะแนนตั้งแต่ 1 (เรืองแสงน้อยที่สุด) ถึงระดับ 5 (เรืองแสงมากที่สุด) ดังอธิบายในวิธีการวิจัยข้อที่ 3

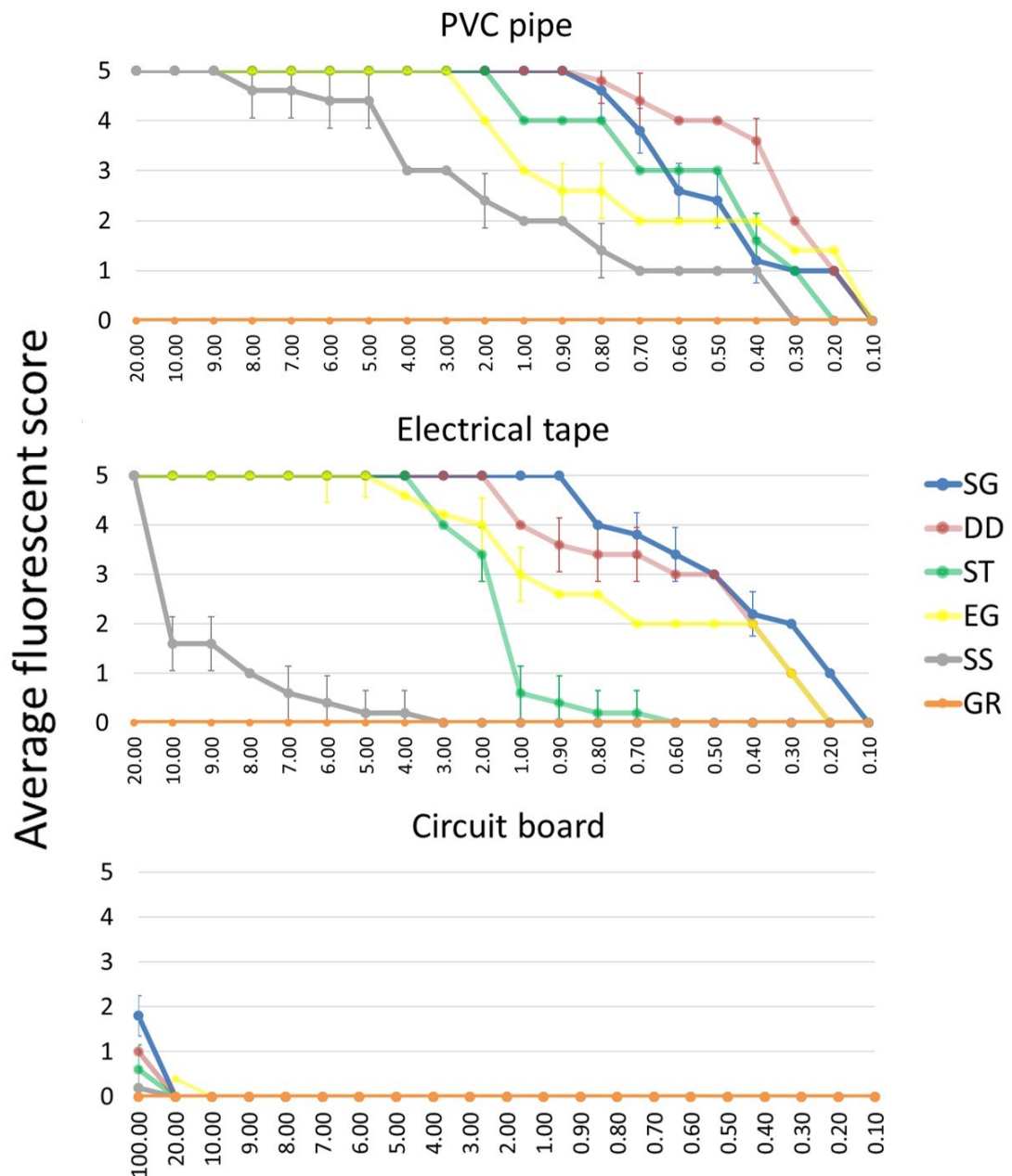
ผลการศึกษาพบว่า สารเรืองแสงจำนวน 5 ชนิด ปรากฏการเรืองแสงเมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสภายใต้การกระตุ้นด้วยพลังงานแสงทางเลือกที่ความยาวคลื่นที่

เหมาะสม ซึ่งได้แก่ สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (SG), Diamond™ Nucleic Acid Dye (DD), SYTOX® Green Nucleic Acid Stain (ST), EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain (EG) และ SYBR® Safe DNA Gel stain (SS) ในขณะที่สารเรืองแสง GelRed™ Nucleic Acid Stain (GR) ไม่ปรากฏการเรืองแสงในทุกวัสดุทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 10 ทั้งนี้ อาจเนื่องจาก GelRed™ เป็นสารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติไม่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ [91] จึงไม่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ได้ ทำให้ไม่ปรากฏการเรืองแสง



ภาพที่ 10 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสเมื่อสเปรย์ด้วยสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (SG), Diamond™ Nucleic Acid Dye (DD), SYTOX® Green Nucleic Acid Stain (ST), SYBR® Safe DNA Gel stain (SS), EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain (EG) และ GelRed™ Nucleic Acid Stain (GR) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสงทางเล็ง ที่ความยาวคลื่นที่สารเรืองแสงแต่ละชนิดสามารถดูดกลืนได้

เมื่อพิจารณาปัจจัยในเรื่องความเข้มข้นของสารเรืองแสงและระดับความเข้มในการเรืองแสงพบว่า สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ให้ผลการเรืองแสงดีที่สุดในทุกวัสดุทดลอง กล่าวคือ สารเรืองแสงดังกล่าวที่ความเข้มข้น 0.9X เป็นสารเรืองแสงความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยังให้ผลการเรืองแสงระดับสูงสุดในทุกวัสดุทดลอง รองลงมาคือ สารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ที่ความเข้มข้นในช่วง 2.0X ดังแสดงในภาพที่ 11 อย่างไรก็ตามพบว่าสารเรืองแสงที่ทำการศึกษาทั้ง 5 ชนิดข้างต้นสามารถใช้ตรวจหาดีเอ็นเอบนวัสดุโปร่งแสง เช่น แผงวงจรไฟฟ้าได้ที่ความเข้มข้นของสารเรืองแสงในช่วง 20X-100X งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain และ Diamond™ Nucleic Acid Dye ในการศึกษาถัดไป



ภาพที่ 11 กราฟแสดงระดับการเรืองแสงของสารเรืองแสงที่ประเมินได้ทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อจับกับดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนพื้นผิววัสดุ 3 ชนิด ได้แก่ ท่อพีวีซี เทปพันสายไฟ และแผงวงจรไฟฟ้า โดยที่ SG คือ SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain, DD คือ Diamond™ Nucleic Acid Dye, ST คือ SYTOX® Green Nucleic Acid Stain, EG คือ EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain และ GR คือ GelRed™ Nucleic Acid Stain (n=164)

2. ผลการศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสง SYBR® Green I และ Diamond™ Dye ต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

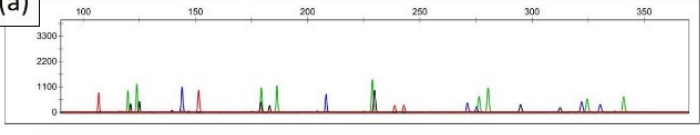
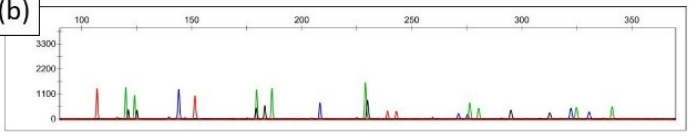
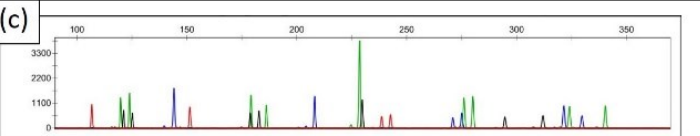
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของชุดน้ำยา สารเรืองแสงสองชนิดที่ให้ผลการเรืองแสงดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งได้แก่ สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain และ Diamond™ Nucleic Acid Dye ต่อคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่ 1) การศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสงต่อลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอควบคุม (control DNA) และ 2) การศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสงต่อลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัส

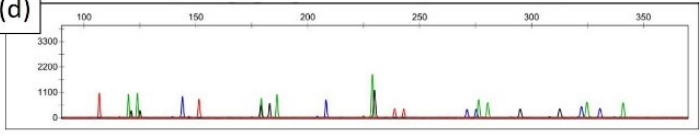
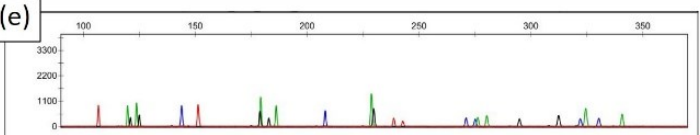
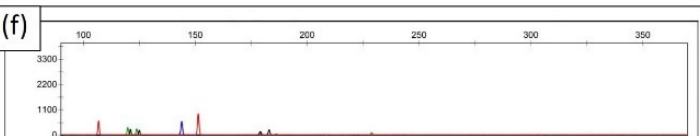
2.1 การศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสงต่อลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสกัด

การทดลองนี้ทำการเติมสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain และสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ลงในปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งบรรจุดีเอ็นเอสกัด ทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่ 0.9X และ 2.0X ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลเรืองแสงดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยเติมสารเรืองแสงดังกล่าวในปริมาตร 0.5, 1.5 และ 3.0 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Identifiler® Plus PCR Amplification (Thermo Fisher Scientific) เพื่อศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสงดังกล่าวต่อคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับ ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาจำนวน 10 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นบันทึกและวิเคราะห์ผลจำนวนอัลลีล ความสูงของพีค และรูปแบบการถูกยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้รับ

ผลการศึกษาพบว่าสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ส่งผลกระทบต่อลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยกว่าสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากชุดตัวอย่างที่เติมสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain มีคุณภาพดีกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เติมสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่าสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่ปริมาตร 0.5 และ 1.5 ไมโครลิตร ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอและให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ คือครบทั้ง 32 อัลลีลในทุกตัวอย่าง และมีความสูงพีคเฉลี่ยอยู่

ที่ 611.1 ± 335.3 และ 587.4 ± 303.1 RFU ตามลำดับ ในขณะที่สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร ส่งผลกระทบต่อลายพิมพ์ดีเอ็นเอเล็กน้อย โดยได้รับอัลลีลเฉลี่ย 31.8 ± 0.4 อัลลีล และมีความสูงพีคเฉลี่ย 499.6 ± 278.2 RFU แสดงดังภาพที่ 12 (a)-(c) ในทางตรงกันข้ามพบว่าสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์จากชุดการทดลองปริมาตร 0.5 ไมโครลิตรเท่านั้นและยังมีความสูงพีคเฉลี่ยต่ำกว่าชุดตัวอย่างที่เติมสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ในปริมาตรเท่ากัน นอกจากนี้การเติมสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ปริมาตร 1.5 และ 3.0 ไมโครลิตร ส่งผลกระทบต่อลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากกว่า กล่าวคือ ได้รับอัลลีลเฉลี่ยเพียง 31.8 ± 0.6 และ 22.0 ± 9.2 อัลลีล และมีความสูงพีคเฉลี่ย 480.4 ± 236.5 และ 355.5 ± 178.8 RFU ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยและความสูงพีคที่ได้รับจากชุดการทดลองเติม Diamond™ Nucleic Acid Dye นี้มีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองเติมสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ทั้งหมด นอกจากนี้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากชุดตัวอย่างที่เติมสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ที่ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร ยังพบรูปแบบการถูกยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibition pattern) กล่าวคือ พบแนวโน้มการลดลงของความสูงพีคหรือการหายไปของอัลลีล (drop out) ในตำแหน่ง STR ขนาดใหญ่อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 12 (d)-(f)

SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain		
DNA profile representative	Average allele number	Average peak height
(a) 	32.0 ± 0.0	611.1 ± 335.3
(b) 	32.0 ± 0.0	587.4 ± 303.1
(c) 	31.8 ± 0.4	499.6 ± 278.2

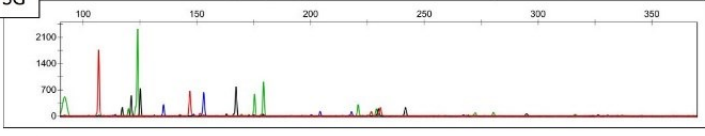
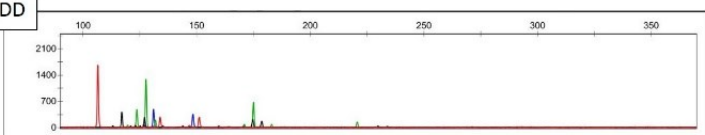
Diamond™ Nucleic Acid Dye		
DNA profile representative	Average allele number	Average peak height
(d) 	32.0 ± 0.0	589.2 ± 278.3
(e) 	31.8 ± 0.6	480.4 ± 236.5
(f) 	22.0 ± 9.2	355.5 ± 178.8

ภาพที่ 12 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวนอัลลีลเฉลี่ย และความสูงพีคเฉลี่ยที่ได้รับจากตัวอย่างที่ใส่สารเรืองแสงลงในน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาตรต่างๆ ได้แก่ สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร (a), 1.5 ไมโครลิตร (b), 3.0 ไมโครลิตร (c) และสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร (d), 1.5 ไมโครลิตร (e) และ 3.0 ไมโครลิตร (f).

2.2 การศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสงต่อลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัส

การทดลองนี้กำหนดให้อาสาสมัครจำนวน 10 คน สัมผัสวัสดุท่อพีวีซีตามวิธีการดังอธิบายในวิธีวิจัยข้อที่ 2 จากนั้นฉีดพ่นสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain และ Diamond™ Nucleic Acid Dye ที่ความเข้มข้น 0.9X และ 2.0X ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลเรืองแสงดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้านี้ ก่อนเก็บกู้ดีเอ็นเอที่เรืองแสงแล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเรคพีซีอาร์และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Identifiler® Plus PCR Amplification (Thermo Fisher Scientific) เพื่อศึกษาผลกระทบของสารเรืองแสงดังกล่าวต่อคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสบนวัสดุหลักฐาน ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาจำนวน 10 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นบันทึกและวิเคราะห์ผลจำนวนอัลลีลและความสูงของพีคที่ได้รับ

ผลการศึกษาสอดคล้องกับการทดลอง 2.1 ซึ่งพบว่า สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ส่งผลกระทบต่อลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยกว่าสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye โดยชุดการทดลองสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 26.2 ± 2.4 อัลลีล ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ที่ได้รับจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 21.5 ± 4.2 ดังแสดงในภาพที่ 13 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain มีความเหมาะสมมากกว่าสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ในการใช้เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนวัสดุหลักฐาน เนื่องจากส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยกว่าอย่างชัดเจน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ในการศึกษาถัดไป

DNA profile representative		Average allele number	Average peak height
SG		26.2 ± 2.4	462.7 ± 28.6
DD		21.5 ± 4.2	501.8 ± 34.2

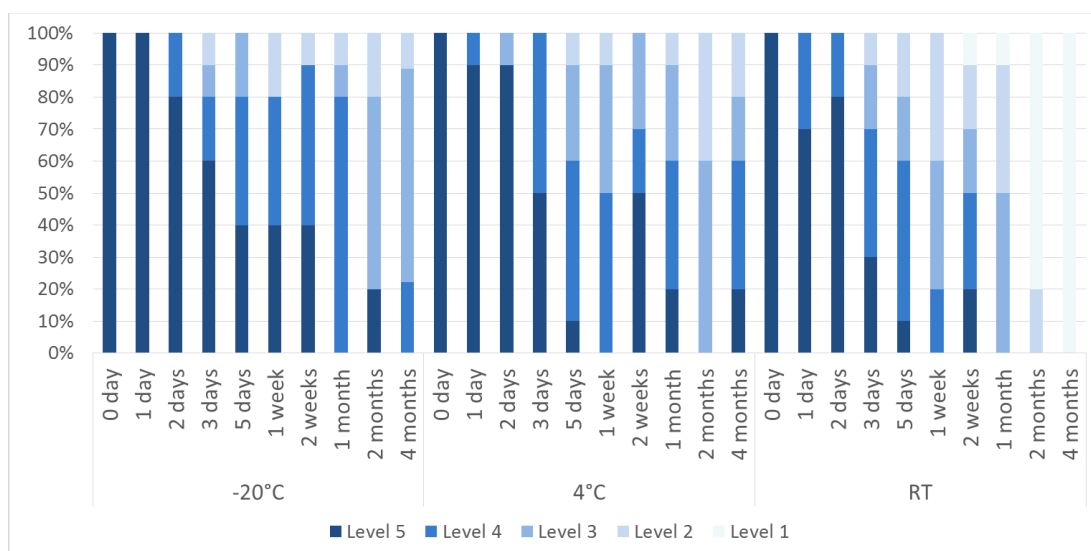
ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวนอัลลีลเฉลี่ย และความสูงพีคเฉลี่ยจากตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (SG) และ สารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye (DD)

3. ผลการศึกษาอายุการใช้งานและวิธีการเก็บรักษาสารเรืองแสงที่พัฒนาขึ้น

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอายุการใช้งานและวิธีการเก็บรักษาสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ความเข้มข้น 0.9X ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลการเรืองแสงดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้า โดยศึกษาปัจจัยด้านอุณหภูมิการเก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสม ทั้งนี้ทำการทดลองเก็บชุดน้ำยาสารเรืองแสงให้พ้นจากแสงภายนอก ในสภาวะอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ต่างกัน 3 อุณหภูมิ ได้แก่ -20°C, 4°C และอุณหภูมิห้อง ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, 5 วัน, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์, 1 เดือน, 2 เดือน และ 4 เดือน จากนั้นนำชุดน้ำยาสารเรืองแสงในแต่ละชุดการทดลองมาทดสอบประสิทธิภาพด้วยการตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสกับวัสดุท่อพีวีซี ภายใต้การส่องแสงจากเครื่องกำเนิดแสงทางเลือกที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทำการประเมินและให้คะแนนความเข้มของการเรืองแสงจากแถบเปรียบเทียบความเข้มการเรืองแสง เช่นเดียวกับก่อนหน้า ทั้งนี้ทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง

ผลการศึกษาพบว่าสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่ความเข้มข้น 0.9X สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 1 วัน โดยยังปรากฏการเรืองแสงที่เข้มในระดับมากที่สุดหรือระดับ 5 ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

และอุณหภูมิห้อง พบการลดลงของการเรืองแสงตั้งแต่วันที่ 1 ดังแสดงในภาพที่ 14 นอกจากนี้ยังพบว่า การเก็บรักษาสารเรืองแสงดังกล่าวที่อุณหภูมิสูงขึ้น ปรากฏแนวโน้มการลดลงของระดับการเรืองแสง เช่น ในระยะเวลาการเก็บรักษา 1 วัน ที่อุณหภูมิการเก็บรักษา -20°C , 4°C และอุณหภูมิห้อง มีจำนวนตัวอย่างที่ปรากฏความเข้มของการเรืองแสงในระดับ 5 คิดเป็นร้อยละ 100, ร้อยละ 90 และร้อยละ 70 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มของการเรืองแสงแปรผกผันกับระยะเวลาการเก็บรักษาในทุกอุณหภูมิที่ทดลอง กล่าวคือ เมื่อสารเรืองแสงถูกเก็บรักษาในระยะเวลาที่นานขึ้นจะปรากฏแนวโน้มการลดลงของระดับการเรืองแสง เช่น ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 วัน 3 วัน และ 5 วัน ณ อุณหภูมิ -20°C มีตัวอย่างที่ปรากฏความเข้มของการเรืองแสงในระดับ 5 เท่ากับร้อยละ 80 ร้อยละ 60 และร้อยละ 40 ตามลำดับ



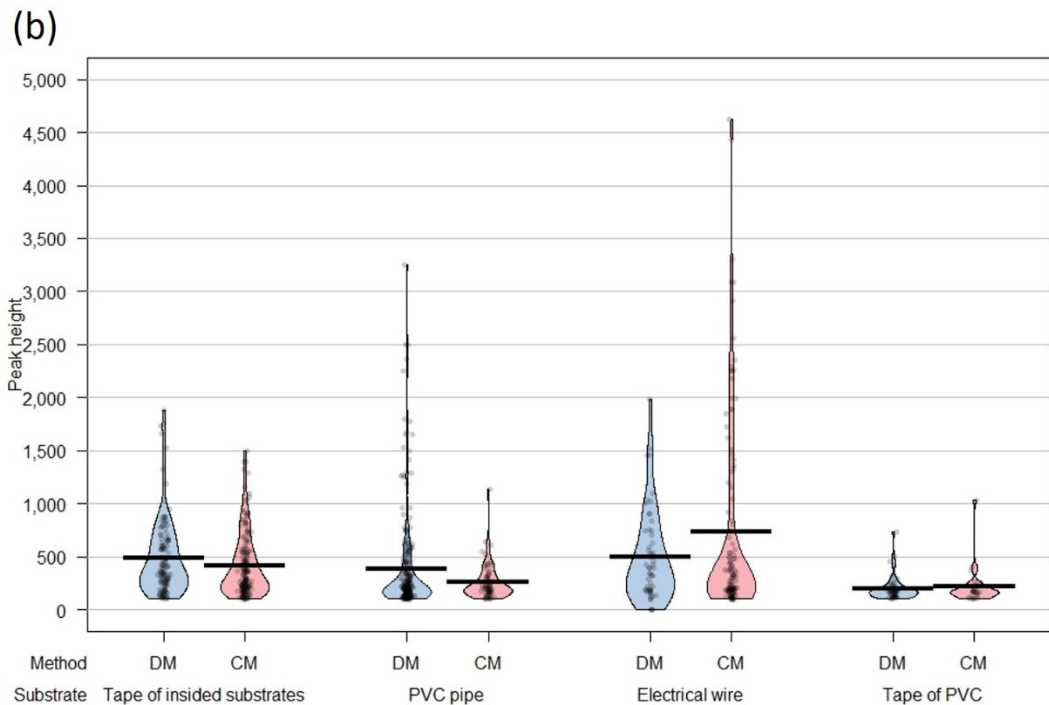
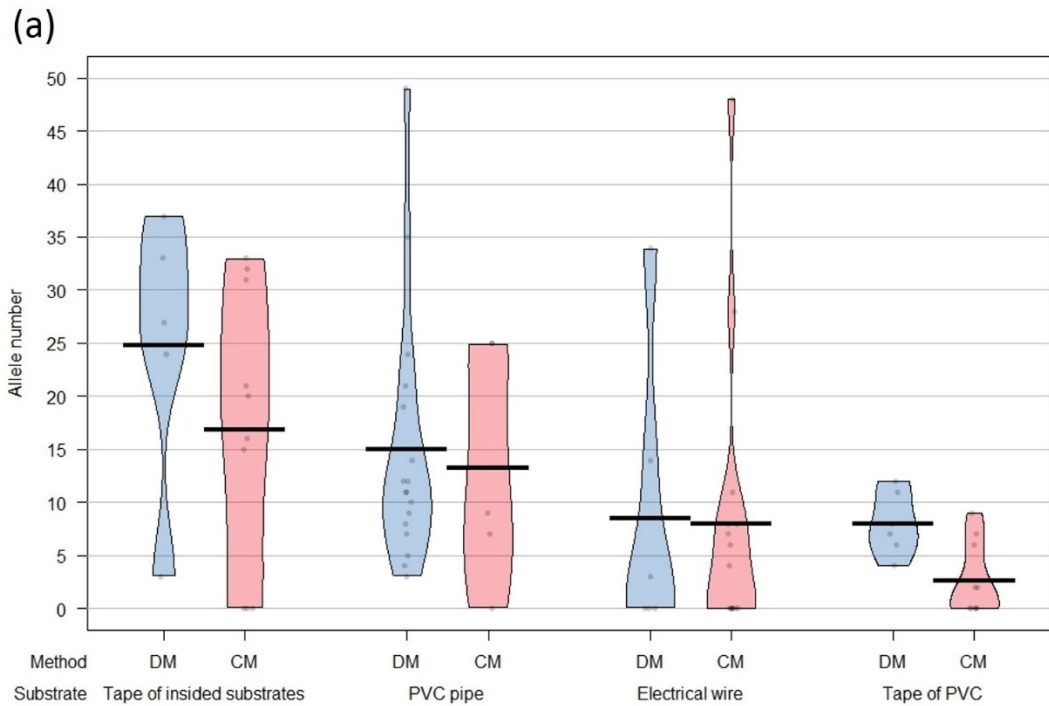
ภาพที่ 14 กราฟแสดงร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่มองเห็นการเรืองแสงในระดับต่างๆ ตั้งแต่ระดับ 1 เรืองแสงน้อยที่สุด จนถึงระดับ 5 เรืองแสงเข้มที่สุด โดยแบ่งออกตามระยะเวลาและอุณหภูมิที่เก็บรักษา

4. การทวนสอบการใช้งานจริงของชุดน้ำยาสารเรืองแสงร่วมกับกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอแบบไดเรคทีซีอาร์กับตัวอย่างระเบิดแสงเครื่องจำลอง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบการใช้งานจริงของสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่ความเข้มข้น 0.9X ร่วมกับกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคทีซีอาร์ เพื่อตรวจหาและตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่องจำลอง โดยกำหนดให้อาสาสมัคร 5 คน ประกอบระเบิดแสงเครื่องจำลองคนละ 2 ชุด รวมทั้งหมด 10 ชุด จากนั้นนำระเบิดแสงเครื่อง 5 ชุดแรกจากอาสาสมัครทั้ง 5 คนไปตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสารเรืองแสงและเทคนิคไดเรคทีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ ในขณะที่ระเบิดแสงเครื่องจำลองอีก 5 ชุดที่เหลือนำไปตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอโดยผู้เชี่ยวชาญตามกระบวนการมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติที่ใช้งานอยู่ในปัจจุบัน เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากวิธีการทั้งสองด้วยการทดสอบทางสถิติ

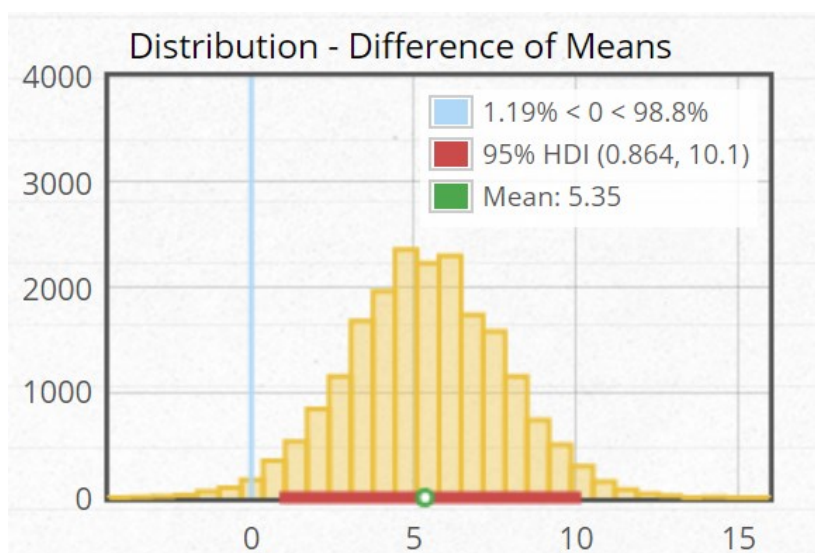
4.1 คุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผลการศึกษาพบว่าชุดน้ำยาสารเรืองแสงและกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคทีซีอาร์ที่พัฒนาในงานวิจัยนี้ มีอัตราความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสงเครื่องจำลองสูงกว่ากระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยนวัตกรรมและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้ให้จำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (full profile) สูงถึงร้อยละ 14.7 (n=34) ในขณะที่จำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่ได้รับจากกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน เท่ากับร้อยละ 7.5 (n=40) นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากชุดน้ำยาสารเรืองแสงและกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคทีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่าสูงกว่าอีกวิธีการในทุกวัสดุทดลอง โดยจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากวัสดุเทปกาวพันสายไฟ วัสดุท่อพีวีซี วัสดุสายไฟ และวัสดุเทปกาวพันท่อพีวีซี เท่ากับ 24.8 ± 13.2 , 14.9 ± 11.9 , 8.5 ± 13.6 และ 8.0 ± 3.0 ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนอัลลีลที่ได้รับจากกลุ่มวัสดุตั้งกล่าวเมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน เท่ากับ 16.8 ± 13.2 , 13.2 ± 11.3 , 8.0 ± 13.3 , 2.6 ± 3.4 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 15 (a)



ภาพที่ 15 กราฟ (a) แสดงจำนวนอัลลีล และกราฟ (b) แสดงความสูงพีคที่ตรวจวัดได้จาก เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสบนระเบิดแสงเครื่องจำลอง โดยแบ่งออกตามชนิดของ วัสดุและวิธีการตรวจพิสูจน์ DM แทนกระบวนการที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ และ CM แทน กระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน เส้นสีดำแสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูล

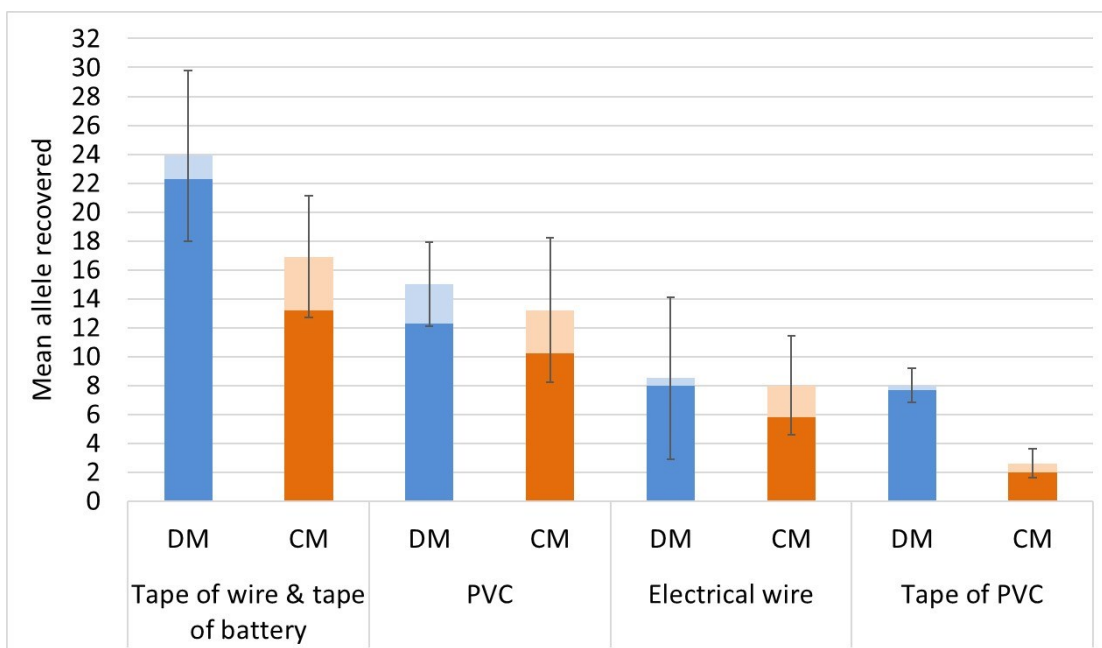
เมื่อทดสอบความแตกต่างของจำนวนอัลลีลเป้าหมายที่ได้รับทั้งหมดจากการใช้กระบวนการที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้กับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน โดย การวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Bayesian Estimation Supersedes the t-test (BEST) พบว่า จำนวนอัลลีลของอาสาสมัครที่ได้รับจากนวัตกรรมและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่าสูงกว่า กระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยพบความแตกต่างของจำนวนอัลลีลที่ได้รับในช่วง 0.9-10.1 อัลลีล ดังแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 กราฟแสดงการกระจายของความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลที่ได้รับจากกระบวนการที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้กับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน

4.2 ความแตกต่างของจำนวนอัลลีลที่แท้จริง (donor's allele) กับอัลลีลปนเปื้อน (non-donor's allele)

ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากกระบวนการทั้งสองรูปแบบปรากฏทั้งอัลลีลเป้าหมายหรืออัลลีลแท้จริงของอาสาสมัครและอัลลีลซึ่งปนเปื้อนอยู่บนวัสดุหลักฐาน เมื่อทดสอบความแตกต่างของอัลลีลจริงและจำนวนอัลลีลปนเปื้อนที่ได้รับจากการใช้กระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้กับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน พบว่า จำนวนเฉลี่ยของอัลลีลปนเปื้อนที่ได้รับจากนวัตกรรมชุดนี้ยาสารเรืองแสงและกระบวนการที่พัฒนาขึ้น มีค่าน้อยกว่าอีกวิธีการในทุกวัสดุทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 17



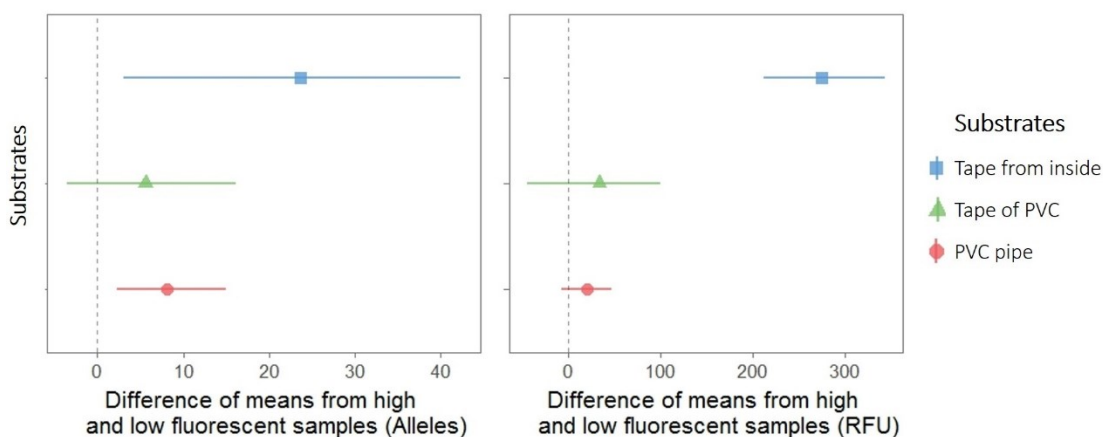
ภาพที่ 17 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากกระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้กับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน โดยสีเข้มแสดงถึงอัลลีลที่แท้จริง (donor's allele) และสีอ่อนแสดงถึงอัลลีลปนเปื้อน (non-donor's allele)

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของการเรืองแสงและคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของการเรืองแสงและคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทำการทดลองโดยเลือกเก็บดีเอ็นเอที่เรืองแสงทั้งความเข้มในการเรืองแสงน้อยในระดับ 1 ถึง 2 และความเข้มการเรืองแสงมากในระดับ 4 ถึง 5 จากตัวอย่างระเบิดแสงเครื่องจำลอง จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Identifiler® Plus PCR Amplification (Thermo Fisher Scientific)

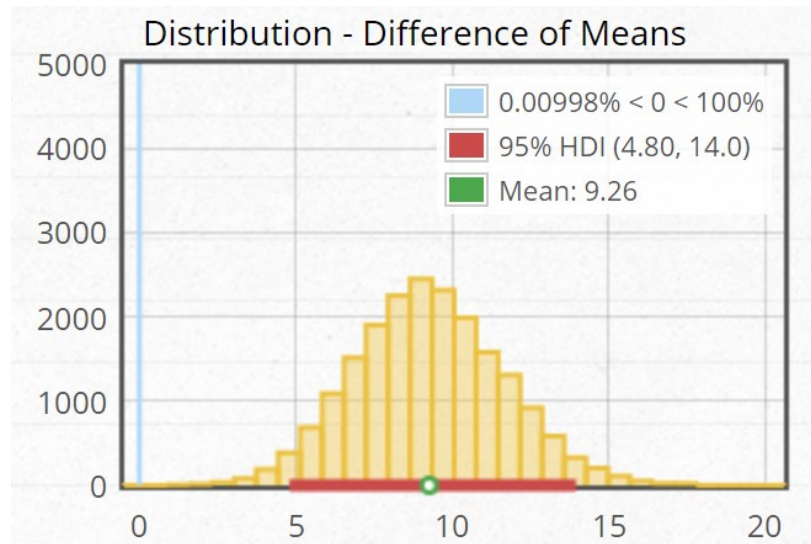
ผลการศึกษาพบว่าระดับของการเรืองแสงมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากบริเวณที่มีการเรืองแสงเข้มมีคุณภาพดีกว่า ซึ่งได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (full profile) สูงถึงร้อยละ 14.7 ในขณะที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากบริเวณที่ปรากฏการเรืองแสงจางนั้นมีคุณภาพต่ำ กล่าวคือ ได้รับ

เพียงลายพิมพ์ดีเอ็นเอบางส่วน (partial profile) และไม่ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์เลย ค่าความแตกต่างของจำนวนอัลลีลและความสูงพีคจากตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม แสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของความแตกต่างของจำนวนอัลลีลและความสูงพีคที่ได้รับจากตัวอย่างบริเวณที่เรืองแสงมากเปรียบเทียบกับบริเวณที่เรืองแสงน้อย โดยแบ่งออกตามชนิดของวัสดุ

เมื่อทดสอบความแตกต่างของจำนวนอัลลีลเป้าหมายที่ได้รับทั้งหมดจากบริเวณที่เรืองแสงเข้มกับบริเวณที่เรืองแสงจาง โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Bayesian Estimation Supersedes the t-test พบว่า จำนวนอัลลีลที่ได้รับจากบริเวณที่เรืองแสงเข้มมีค่าสูงกว่าบริเวณที่เรืองแสงจางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยพบความแตกต่างของจำนวนอัลลีลที่ได้รับในช่วง 5.3-15.3 อัลลีล ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 กราฟแสดงการกระจายของความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลที่ได้รับจากกระบวนการที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้กับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน

บทที่ 4

วิเคราะห์ผล

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องทั้งระบบ ด้วยการสร้างนวัตกรรมสำหรับระบุตำแหน่งของดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องโดยใช้ชุดน้ำยาสารเรืองแสงร่วมกับการพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเรคพีซีอาร์ได้สำเร็จ อีกทั้งยังทวนสอบการใช้งานจริงของกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างระเบิดแสวงเครื่องจำลองอีกด้วย ทั้งนี้ปัจจัยที่ส่งเสริมความสำเร็จดังกล่าวมีหลายประการ เช่น คุณสมบัติและการเลือกใช้สารเรืองแสงที่เหมาะสม การเก็บรักษาชุดน้ำยาสารเรืองแสง การพัฒนากระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบไคเรคพีซีอาร์ที่เหมาะสม เป็นต้น โดยจะกล่าวถึงรายละเอียดของปัจจัยเหล่านี้ต่อไป

1. คุณสมบัติและการเลือกใช้สารเรืองแสงที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาดีเอ็นเอจากการสัมผัส

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารเรืองแสงทั้ง 6 ชนิด พบว่า สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว กล่าวคือ เป็นสารเรืองแสงที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยังให้ผลการเรืองแสงในระดับสูงสุดในทุกวัสดุทดลอง และส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยที่สุด ทั้งนี้ อาจเนื่องจากสารเรืองแสงชนิดนี้มีกลไกในการจับกับดีเอ็นเอหลายรูปแบบ ได้แก่ กลไกการจับบริเวณร่องเล็กของเกลียวดีเอ็นเอ กลไกการจับตรงตำแหน่งระหว่างเบสคู่สมของดีเอ็นเอ และกลไกการจับด้วยความเสถียรของขั้วไฟฟ้า [92] ในขณะที่สารเรืองแสงอื่นๆ มีกลไกในการจับกับดีเอ็นเอเพียง 1-2 รูปแบบเท่านั้น เช่น สารเรืองแสง SYTOX® Green Nucleic Acid Stain สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอโดยใช้กลไกการจับตรงตำแหน่งระหว่างเบสคู่สมของดีเอ็นเอและการจับด้วยความเสถียรของขั้วไฟฟ้า [93] ส่วนสารเรืองแสง SYBR® Safe DNA Gel stain จับกับดีเอ็นเอบริเวณร่องของเกลียวดีเอ็นเอ [50] เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain สามารถจับกับดีเอ็นเอและเกิดการเรืองแสงได้มากกว่าสารเรืองแสงชนิดอื่นๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ซึ่งพบว่าสารเรืองแสง SYBR® Green I

Nucleic Acid Gel Stain สามารถเรืองแสงเพิ่มขึ้นได้กว่า 1,000 เท่าเมื่อจับกับดีเอ็นเอ [92] นอกจากนี้สารเรืองแสงดังกล่าวยังมีคุณสมบัติในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ทำให้สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ได้ [94] ส่งผลให้สามารถเรืองแสงได้มากขึ้น ในขณะที่สารเรืองแสงชนิดอื่นๆ เช่น สารเรืองแสง Evagreen™ และ GelRed™ ไม่มีคุณสมบัติซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้จับกับดีเอ็นเอภายนอกเซลล์ได้เพียงอย่างเดียว จึงอาจทำให้ประสิทธิภาพการเรืองแสงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain

นอกจากนี้สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ยังมีคุณสมบัติอื่นๆที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานกล่าวคือ สารเรืองแสงดังกล่าวมีความเป็นพิษต่ำ (low cytotoxicity) และมีความเป็นสารก่อมะเร็งต่ำ (low mutagenic property) ที่ความเข้มข้น 10,000 เท่า [95] ซึ่งงานวิจัยนี้ทำการเจือจางสารเรืองแสงดังกล่าวด้วยน้ำกลั่นสะอาดกว่า 11,000 เท่า เพื่อปรับให้อยู่ในสูตรความเข้มข้นที่เหมาะสมแก่การใช้งานคือ 0.9X ดังนั้นชุดน้ำยาสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้จึงมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้งานสูงมาก เนื่องจากความเข้มข้นของสารเรืองแสงสูตรที่พัฒนาขึ้นอยู่ในระดับที่เจือจางกว่าความเข้มข้นที่เป็นพิษดังกล่าว นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปัจจัยในเรื่องต้นทุนน้ำยาสารเรืองแสง พบว่า สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain มีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำ คือประมาณ 1.40 บาทเท่านั้น ในขณะที่สารเรืองแสงอื่นๆมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างสูง คือในช่วง 9-750 บาท อย่างไรก็ตามผลการศึกษาพบว่าสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye มีประสิทธิภาพที่ดีต่อการจับกับดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสร่องลงมา อีกทั้งยังมีความเป็นพิษและมีค่าใช้จ่ายต่ำ คือประมาณ 0.90 บาทต่อตัวอย่าง [50] ดังนั้นด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด จึงนำสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain และ Diamond™ Nucleic Acid Dye ไปใช้ทดลองในการศึกษาถัดไป

2. ผลกระทบของสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain และ Diamond™ Nucleic Acid Dye ต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการเปรียบเทียบผลกระทบของสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain และ Diamond™ Nucleic Acid Dye ต่อคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่า สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ส่งผลกระทบต่อลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยกว่าสารเรืองแสงอีกชนิดหนึ่ง ทำให้ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีกว่าจากทั้งชุดการทดลองที่ใช้ดีเอ็นเอสกัดและดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัส ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่เหมาะสมและใช้ในการศึกษานี้ คือ 0.9X ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นของสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye (2.0X) อีกทั้งเคยมีการรายงานของนักวิจัยกลุ่มอื่นว่าสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain มีผลยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.0X ในขณะที่สารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye มีผลยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้สมบูรณ์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.5X [96, 97] ดังนั้นเหล่านี้จึงอธิบายเหตุผลที่สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยกว่าสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye

อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Alicia และคณะในปี พ.ศ. 2558 ซึ่งพบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมกับสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain มีผลประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้อยกว่าชุดการทดลองด้วยสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye กล่าวคือ สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ส่งผลยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์มากกว่า ทำให้จำนวนอัลลีลและความสูงพีคเฉลี่ยที่ได้รับต่ำกว่าชุดการทดลองสารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye [90] โดยงานวิจัยดังกล่าวอธิบายสาเหตุว่ามาจากการที่สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ครอบคลุมไปกการจับดีเอ็นเอของตัวกรองซิลิกา (silica filter) ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ประสิทธิภาพในการจับกับดีเอ็นเอของตัวกรองซิลิกาลดลง ส่งผลให้สูญเสียดีเอ็นเอไปในขั้นตอนดังกล่าวจำนวนมาก และล้มเหลวในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่พบปัญหาดังกล่าวเนื่องจากกระบวนการที่พัฒนาขึ้นเป็นการใช้สารเรืองแสงร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเรคพีซีอาร์ ซึ่งเป็น

เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงโดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด เป็นผลทำให้งานวิจัยนี้ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจากชุดการทดลองสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ได้สำเร็จ

3. ปัจจัยที่ส่งผลต่ออายุการใช้งานและวิธีการเก็บรักษาสารเรืองแสงที่พัฒนาขึ้น

จากผลการศึกษาอายุการใช้งานและวิธีการเก็บรักษาสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ความเข้มข้น 0.9X ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลการเรืองแสงดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า สารเรืองแสงความเข้มข้นดังกล่าวสามารถเก็บรักษาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 วัน โดยยังปรากฏการเรืองแสงที่เข้มในระดับมากที่สุด ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้องพบว่าการลดลงของการเรืองแสงตั้งแต่วันที่ 1 ของการเก็บรักษา แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิการเก็บรักษามีผลกระทบต่อประสิทธิภาพและความเสื่อมสภาพของชุดน้ำยาดังกล่าว โดยอุณหภูมิที่ต่ำสามารถรักษาคุณสมบัติของสารเรืองแสงให้มีประสิทธิภาพคงเดิมได้ดีกว่า ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงโมเลกุลของน้ำที่ผสมในสารละลายสารเรืองแสงจะเกิดการสั่น (molecular vibration) ได้มากขึ้น ทำให้เกิดการแตกตัวของโมเลกุลน้ำและฟอร์มตัวเป็นไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion, H^+) มากขึ้น [98] ส่งผลให้ค่า pH ของสารละลายสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ลดลง ซึ่งการลดลงของค่า pH นี้ ส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพและประสิทธิภาพการเรืองแสงของสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain โดยค่าความเป็นกรดเบสที่ทำให้สารเรืองแสงดังกล่าวมีเสถียรภาพ คือช่วง pH 7.5-8.0 [99] นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดเบสของสารเรืองแสงยังส่งผลต่อประจุของสารและอาจส่งผลกระทบต่อกลไกการจับกับ ดีเอ็นเอด้วยความเสถียรของขั้วไฟฟ้า (stabilization of electrostatic) [92] ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ในการจับกับดีเอ็นเอ

เมื่อพิจารณาปัจจัยในเรื่องเวลาการเก็บรักษา พบว่า เมื่อเก็บรักษาชุดน้ำยาสารเรืองแสงเป็นระยะเวลาสั้นจะส่งผลให้เสถียรภาพของสารเรืองแสงลดลงเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเก็บสารละลาย SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่ผสมน้ำกลั่นเป็นเวลานาน โมเลกุลของน้ำจะเกิดการแตกตัวและฟอร์มตัวเป็นไฮโดรเจนไอออน (H^+) ได้มากขึ้น ทำให้ค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายสารเรืองแสงดังกล่าวลดลง และส่งผลกระทบต่อ

ความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอและประสิทธิภาพของสารเรืองแสงดังที่อธิบายข้างต้น เช่นเดียวกัน

ปัจจัยอื่นๆที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารเรืองแสงในการจับกับดีเอ็นเอ ได้แก่ ชนิดของวัสดุที่ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ สภาวะแวดล้อมในการเก็บรักษา และความหนืดของสารละลายที่นำมาใช้ผสมกับสารเรืองแสง [92] โดยชนิดของวัสดุที่ใช้ผลิต บรรจุภัณฑ์บางชนิด เช่น แก้วหรือพลาสติกทั่วไปจะสามารถจับกับโมเลกุลของสารเรืองแสงได้ ทำให้จำนวนโมเลกุลของสารเรืองแสงในสารละลายลดลงจากเดิม ส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารเรืองแสงในการจับกับดีเอ็นเอลดลง ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงบรรจุภัณฑ์ประเภทแก้วหรือพลาสติกทั่วไป ควรใช้บรรจุภัณฑ์ประเภทโพลีโพรพิลีน (polypropylene) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีผลกระทบน้อยที่สุดในการจับโมเลกุลของสารเรืองแสง [99] นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมในการเก็บรักษาสามารถส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารเรืองแสงได้เช่นเดียวกัน โดยการเก็บรักษาสารเรืองแสงให้พ้นจากแสงภายนอกจะช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของสารเรืองแสงได้ เนื่องจากแสงภายนอกจะมีองค์ประกอบส่วนหนึ่งเป็นแสงยูวี (UV) และแสงที่สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain สามารถดูดกลืนได้ โดยแสงเหล่านี้จะทำให้โครงสร้างสาร SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain เปลี่ยนสภาพไปจากเดิมหรืออาจทำลายพันธะโควาเลนต์ภายในโมเลกุล ทำให้ประสิทธิภาพการเรืองแสงลดลง เรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่าโฟโตบลีชชิ่ง (photobleaching) [100, 101] เพื่อป้องกันและรักษาเสถียรภาพของชุดน้ำยาสารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain งานวิจัยนี้จึงเก็บรักษาสารเรืองแสงดังกล่าวในขวดบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตจากวัสดุ polypropylene รวมทั้งป้องกันแสงจากภายนอกตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามงานวิจัยในอนาคตอาจมีการทดลองปรับเปลี่ยนสารละลายที่ใช้เจือจางสารเรืองแสงเพื่อเพิ่มการรักษาเสถียรภาพและประสิทธิภาพในการเรืองแสง เช่น สารละลายที่ช่วยรักษาค่า pH เช่น สารละลาย DMSO และ PBS หรือสารละลายที่มีความหนืดสูงขึ้น เช่น glycerol [92] เป็นต้น

4. การทวนสอบการใช้งานจริงของชุดน้ำยาสารเรืองแสงร่วมกับกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอแบบไดเรคทีซีอาร์กับตัวอย่างระเบิดแสวงเครื่องจำลอง

ผลการเปรียบเทียบคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการใช้ชุดน้ำยาสารเรืองแสงและกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคทีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐานพบว่า กระบวนการที่พัฒนาขึ้นมีอัตราความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องจำลองสูงกว่า โดยให้จำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์สูงถึงร้อยละ 14.7 ในขณะที่จำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่ได้รับจากกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐานมีเพียงร้อยละ 7.5 เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากการใช้สารเรืองแสงที่พัฒนาขึ้นทำให้สามารถมองเห็นและระบุตำแหน่งของดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัสดุได้ จึงสามารถเลือกเก็บตัวอย่างเฉพาะตำแหน่งที่พบการเรืองแสงส่งผลให้ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูงและมีความสำเร็จสูงขึ้น ในขณะที่กระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐานนั้นทำการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสแบบสุ่มทั่วพื้นผิววัสดุหลักฐานในคราวเดียวโดยอาศัยประสบการณ์ ไม่สามารถระบุตำแหน่งของดีเอ็นเอหรือจำกัดขนาดของพื้นที่ที่จะทำการเก็บกู้ดีเอ็นเอได้ จึงอาจไม่ได้รับ ดีเอ็นเอหรือทำให้ดีเอ็นเอที่เก็บกู้ได้หลุดกลับไปติดอยู่บนพื้นผิววัสดุหลักฐานส่วนอื่นๆ ส่งผลให้ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอคุณภาพต่ำ หรือเกิดความล้มเหลวในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังใช้เทคนิคไดเรคทีซีอาร์ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยตรงโดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด จึงลดการสูญเสียดีเอ็นเอจากขั้นตอนดังกล่าว [9] ทำให้โอกาสความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสูงขึ้น

ชุดน้ำยาสารเรืองแสงและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้ยังทำให้ได้รับจำนวนอัลลีลที่แท้จริงหรืออัลลีลเป้าหมายของอาสาสมัครผู้ประกอบระเบิด (donor's allele) มากกว่ากระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการตรวจเก็บดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องโดยใช้ชุดน้ำยาสารเรืองแสงที่พัฒนาขึ้นสามารถช่วยคัดเลือกดีเอ็นเอจากแหล่งที่มาเดียวและลดการเกิดดีเอ็นเอโปรไฟล์แบบผสมระหว่างหลายบุคคลได้ ซึ่งสอดคล้องกับในงานวิจัยของ Ostojic และคณะในปี พ.ศ. 2560 ที่พบว่าการแบ่งเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากพื้นที่ย่อยได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก

แหล่งที่มาเดี่ยวหรืออัลลีลที่แท้จริงมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ใหญ่ในคราวเดียว ส่งผลให้ช่วยลดปัญหาดีเอ็นเอแบบผสมและช่วยลดความยุ่งยากในการแปลผล [102]

นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากบริเวณที่มีการเรืองแสงเข้มมีคุณภาพดีกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากบริเวณที่ปรากฏการเรืองแสงจาง แสดงให้เห็นว่าความเข้มของการเรืองแสงมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณที่มีการเรืองแสงเข้มนั้นคือบริเวณที่มีปริมาณดีเอ็นเอมาก ทำให้สารเรืองแสงเข้าไปจับและเกิดการเรืองแสงได้มาก ดังนั้นเมื่อเก็บกู้ดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าวไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงมีโอกาสำเร็จในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอคุณภาพดีสูง แสดงให้เห็นว่าความเข้มของการเรืองแสงสามารถระบุโอกาสในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้เบื้องต้น

เมื่อพิจารณาความสำเร็จและคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เกิดจากการสัมผัสวัสดุหลักฐานระเบิดแสงเครื่องจำลองชนิดต่างๆพบว่า ชนิดของวัสดุส่งผลต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับ โดยผลการศึกษาพบว่า เทปกาวพันสายไฟซึ่งบรรจุอยู่ในท่อพีวีซีเป็นวัสดุที่สามารถเก็บกู้ดีเอ็นเอและตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้จำนวนอัลลีลมากที่สุด รองลงมาคือเทปกาวที่ใช้พันแบตเตอรี่ ท่อพีวีซี สายไฟ และเทปกาวที่ใช้พันท่อพีวีซีภายนอก ทั้งนี้จำนวนอัลลีลที่ได้รับขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ลักษณะการใช้งานหรือการประกอบระเบิด วิธีการสัมผัส แรงกด และทิศทางในการสัมผัสวัสดุ รวมทั้งจำนวนครั้งในการสัมผัสซ้ำๆ ลงบนวัสดุนั้น [32] เช่น เทปกาวพันสายไฟและเทปกาวพันแบตเตอรี่ซึ่งมีขนาดเล็กและต้องออกแรงกดขณะประกอบ จึงทำให้มีเซลล์และดีเอ็นเออิสระหลุดออกมาติดอยู่มากกว่าเทปกาวส่วนที่ใช้พันท่อพีวีซีภายนอกซึ่งอาสาสมัครส่วนใหญ่มักจะจับแกนของเทปกาวไม่ได้จับหรือกดลงบนผิวของเทปกาว เป็นต้น นอกจากนี้ปริมาณของดีเอ็นเอจากการสัมผัสยังขึ้นอยู่กับลักษณะพื้นผิวของวัสดุอีกด้วย โดยวัสดุที่มีพื้นผิวหยาบหรือมีรูพรุนจะสามารถขูดลอกเซลล์ผิวหนังให้มาติดได้ดีกว่าวัสดุพื้นผิวเรียบไม่มีรูพรุน [103]

5. การศึกษาผลบวกปลอม (artifact)

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้รับในการศึกษานี้จำนวน 204 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัส 116 ตัวอย่าง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของดีเอ็นเอสกัด 60 ตัวอย่าง และลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวก อย่างละ 14 ตัวอย่าง พบผลบวกปลอมทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ split peak, stutter และ pull-up ซึ่งเกิดได้จากตัวอย่างหรือเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

ผลบวกปลอม stutter คือ อัลลีลที่มีหน่วยซ้ำน้อยกว่าอัลลีลที่คาดหวัง 1 หน่วยซ้ำ มีความสูงพีคประมาณ 15-20 เปอร์เซ็นต์ของพีคจริง โดยงานวิจัยนี้พบผลบวกปลอม stutter ในสัดส่วนมากที่สุดคือร้อยละ 66 ซึ่งผลบวกปลอมดังกล่าวมีสาเหตุมาจากการเลื่อนหลุดของสายดีเอ็นเอต้นแบบ หรือสายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในระหว่างกระบวนการพีซีอาร์ ทำให้เกิดการเพิ่มหรือลดจำนวนหน่วยซ้ำขึ้น [104] ทั้งนี้เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างเป็นเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสซึ่งเป็นดีเอ็นเอปริมาณน้อย (LCN) และมีการเพิ่มจำนวนรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์จากเดิม 29 รอบเป็น 32 รอบ ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดผลบวกปลอมประเภท stutter มากในงานวิจัยนี้ [105]

split peak คือ อัลลีลที่มีลักษณะปลายพีคแตกออกจากกัน พบในสัดส่วนร้อยละ 5 ซึ่ง split peak มีสาเหตุมาจากการที่เอนไซม์พอลิเมอเรส (polymerase) ทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ เนื่องจากเติมเบสอะดีนีน (adenine) ปลายสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นด้าน 3' ไม่สมบูรณ์ ทำให้ดีเอ็นเอบางชิ้นขาดเบสอะดีนีนไป (-A) ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในส่วนปลาย 3' นี้ [104]

ผลบวกปลอม pull-up คือ การที่เบสไลน์ (base line) ของสีอื่นๆ ในกราฟอิเล็กโทรโฟโรแกรม (electropherogram) ถูกดึงขึ้นมาอยู่ใต้พีคหนึ่งพีค แสดงให้เห็นเป็นแถบสีชมพูในทุกตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ทำการตรวจวิเคราะห์ที่มีขนาดเท่ากัน พบในสัดส่วน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง pull up มีสาเหตุมาจากตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอที่มากเกินไปในกระบวนการเพิ่มปริมาณและตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จนเกินความสามารถในการตรวจวัด (limit of detection) ของเครื่องแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis) ทำให้ไม่สามารถตรวจแยกแถบสีที่ซ้อนทับกันได้ [104]

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้พัฒนาชุดน้ำยาสารเรืองแสงสำหรับตรวจหาดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสงเครื่อง ร่วมกับพัฒนากระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เรืองแสงด้วยเทคนิคไดเรคทีซีอาร์ได้สำเร็จ โดยสามารถประยุกต์ใช้ผลผลิตที่พัฒนาขึ้นได้กับวัสดุทุกประเภท ยกเว้นวัสดุที่มีสีเขียว ผลผลิตของงานวิจัยสามารถเพิ่มโอกาสความสำเร็จในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคดีระเบิดแสงเครื่องจำลองได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ทั้งนี้ชุดน้ำยาสารเรืองแสงที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่ความเข้มข้น 0.9X ซึ่งเป็นสูตรความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้การเรืองแสงสูงสุด มีความเป็นพิษและความเป็นสารก่อมะเร็งต่ำ ปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน และมีอายุการใช้งาน 1 วันหลังจากผสมน้ำยา เมื่อเก็บให้พ้นจากแสงภายนอกที่อุณหภูมิ -20°C

ผลผลิตของงานวิจัยนี้สามารถช่วยลดระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสงเครื่องเหลือครึ่งหนึ่งของวิธีมาตรฐาน คือใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์เพียง 4 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง อีกทั้งยังช่วยลดงบประมาณค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้ถึง 480 บาทต่อตัวอย่าง หรือเป็นจำนวนเงินมากถึง 14,400,000 บาทต่อปี (ประมาณจำนวนตัวอย่างระเบิดแสงเครื่องที่ตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ 30,000 ตัวอย่างต่อปีงบประมาณ (ข้อมูลจากตำรวจพิสูจน์หลักฐาน ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ)) นอกจากนี้ผลงานวิจัยในครั้งนี้นี้ยังสามารถลดจำนวนชั่วโมงทำงานของเจ้าหน้าที่และเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานความมั่นคงของประเทศ รวมทั้งอาจช่วยลดจำนวนเหตุการณ์ความไม่สงบ ลดความแบ่งแยกของประชาชนในพื้นที่ เพิ่มความมั่นใจของประชาชนต่อการทำงานของเจ้าหน้าที่รัฐ และอาจเป็นส่วนหนึ่งในการนำความสงบสุขกลับคืนสู่จังหวัดชายแดนใต้ได้ในอนาคต

ตารางที่ 3 สรุปเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสารเรืองแสงและกระบวนการที่พัฒนาขึ้น
ในงานวิจัยนี้ และกระบวนการมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ

ผลกระทบ	กระบวนการที่พัฒนาขึ้น	กระบวนการมาตรฐาน
อัตราความสำเร็จ (ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์)	ร้อยละ 14.7	ร้อยละ 7.5
ระยะเวลาดำเนินการ	4 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง
ค่าใช้จ่ายตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ต่อตัวอย่าง	2,030 บาท	2,510 บาท
ค่าใช้จ่ายตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อปี (30,000 ตัวอย่าง)	60,900,000 บาท	75,300,000 บาท
ค่าใช้จ่ายที่ลดลงต่อปี	14,400,000	
ชั่วโมงการทำงานและผลกระทบต่อสังคม	ไม่สามารถประเมินค่าได้	

บรรณานุกรม

1. The Institute for Economics and Peace. *Global Terrorism Index 2017*. 2017. (55): p. 10.
2. Haemindra, N., *The Problem of the Thai-Muslims in the Four Southern Provinces of Thailand (Part One)*. *Journal of Southeast Asian Studies*, 2011. 7(2): p. 197-225.
3. ศูนย์ข่าวภาคใต้. เบียดงปี 61 บูรณาการดับไฟใต้ 1.3 หมื่นล้านบาท. 2018 [Accessed 2018 October, 9]; Available from: <https://www.isranews.org/content-page/67-south-slide/60551-money.html>.
4. ศรีสมภพ จิตภิรมย์ศรี. ความขัดแย้งชายแดนใต้ในรอบ 13 ปี: ความซับซ้อนของสนามความรุนแรงและพลังของบทสนทนาสันติภาพปาตานี. 2017 [Accessed 2018 October, 9]; Available from: <https://deepsouthwatch.org/th/node/11053>.
5. Phetpeng, S., Kitpipit, T., and Thanakiatkrai, P., *Systematic study for DNA recovery and profiling from common IED substrates: From laboratory to casework*. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2015. 17: p. 53-60.
6. Berti, A., Barni, F., Virgili, A., Colozza, C., Maiorino, F., and Tocca, M., *The recovery of DNA profiles from saliva and touch evidences after postal bomb explosion*. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, 2011. 3(1): p. e471-e472.
7. Esslinger, K.J., Siegel, J.A., Spillane, H., and Stallworth, S., *Using STR analysis to detect human DNA from exploded pipe bomb devices*. *J. Forensic Sci.*, 2004. 49(3): p. 481-484.
8. Phipps, M. and Petricevic, S., *The tendency of individuals to transfer DNA to handled items*. *Forensic. Sci. Int.*, 2007. 168(2-3): p. 162-168.
9. Swaran, Y.C. and Welch, L., *A comparison between direct PCR and extraction to generate DNA profiles from samples retrieved from various substrates*. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2012. 6(3): p. 407-412.
10. Swaran, Y.C., *Direct PCR in forensic science - an overview*. *Malays. J. Forensic Sci.*, 2014. 5: p. 6-12.
11. Sharma, R., Kumar, V., Mohapatra, T., Khandelwal, V., and Vyas, G.K., *A simple and non-destructive method of direct-PCR for plant systems*. *J. Plant Biol.*, 2012. 55(2): p. 114-122.

12. Rogers, H.J. and Parkes, H.C., *Direct PCR amplification from leaf discs*. Plant Sci., 1999. 143(2): p. 183-186.
13. Wang, D.Y., Chang, C.W., Oldroyd, N.J., and Hennessy, L.K., *Direct amplification of STRs from blood or buccal cell samples*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2009. 2(1): p. 113-114.
14. Yang, Y.G., Kim, J.Y., Song, Y.H., and Kim, D.S., *A novel buffer system, AnyDirect, can improve polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation*. Clin. Chim. Acta, 2007. 380(1-2): p. 112-117.
15. Verheij, S., Harteveld, J., and Sijen, T., *A protocol for direct and rapid multiplex PCR amplification on forensically relevant samples*. Forensic Sci. Int. Genet., 2012. 6(2): p. 167-175.
16. Kitpipit, T., Thanakiatkrai, P., and Chotigeat, W., *Direct PCR-FINS: Wildlife species identification without DNA extraction*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2013. 4(1): p. e364-e365.
17. Kitpipit, T., Sittichan, K., and Thanakiatkrai, P., *Are these food products fraudulent? Rapid and novel triplex-direct PCR assay for meat identification*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2013. 4(1): p. e33-e34.
18. Kitpipit, T., Sittichan, K., and Thanakiatkrai, P., *Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products*. Food Chem., 2014. 163: p. 77-82.
19. Martin, B., Blackie, R., Taylor, D., and Linacre, A., *DNA profiles generated from a range of touched sample types*. Forensic Sci. Int. Genet., 2018. 36: p. 13-19.
20. Blackie, R., Taylor, D., and Linacre, A., *DNA profiles from clothing fibers using direct PCR*. Forensic Sci. Med. Pathol., 2016. 12(3): p. 331-335.
21. Templeton, J.E.L., Taylor, D., Handt, O., and Linacre, A., *DNA profiles from fingerprints: A mock case study*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2015. 5: p. e154-e155.
22. Glazer, A.N. and Rye, H.S., *Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection*. Nature, 1992. 359(6398): p. 859-861.
23. Barni, F., Lewis, S.W., Berti, A., Miskelly, G.M., and Lago, G., *Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection*. Talanta, 2007. 72(3): p. 896-913.

24. Budowle, B., Leggitt, J.L., Defenbaugh, D.A., Keys, K.M., and Malkiewicz, S.F., *The presumptive reagent fluorescein for detection of dilute bloodstains and subsequent STR typing of recovered DNA*. J. Forensic Sci., 2000. 45(5): p. 1090-1092.
25. Thanakiatkrai, P., Raham, K., Pradutkanchana, J., Sothibandhu, S., and Kitpipit, T., *Direct-STR typing from presumptively-tested and untreated body fluids*. Forensic Sci. Int. Genet., 2017. 30: p. 1-9.
26. Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., and Moorman, A.F., *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data*. Neurosci. Lett., 2003. 339(1): p. 62-66.
27. Haines, A.M. and Linacre, A., *A rapid screening method using DNA binding dyes to determine whether hair follicles have sufficient DNA for successful profiling*. Forensic. Sci. Int., 2016. 262: p. 190-195.
28. Haines, A.M., Tobe, S.S., Kobus, H., and Linacre, A., *Finding DNA: Using fluorescent in situ detection*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2015. 5: p. e501-e502.
29. Kanokwongnuwut, P., Kirkbride, K.P., and Linacre, A., *Detection of latent DNA*. Forensic Sci. Int. Genet., 2018. 37: p. 95-101.
30. Kanokwongnuwut, P., Martin, B., Kirkbride, K.P., and Linacre, A., *Shedding light on shedders*. Forensic Sci. Int. Genet., 2018. 36: p. 20-25.
31. Kanokwongnuwut, P., Kirkbride, P., and Linacre, A., *Visualising latent DNA on swabs*. Forensic. Sci. Int., 2018. 291: p. 115-123.
32. Haines, A.M., Tobe, S.S., Kobus, H., and Linacre, A., *Detection of DNA within fingerprints*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2013. 4(1): p. e290-e291.
33. ทีมข่าวอิศรา. 11 ปีไฟใต้...ตายครึ่งหมื่น ปีนถูกปล้น 2,000 กระบอกรบทะเล 2.3 แสน ล้าน. ปีนถูกปล้น 2 พันกระบอก! 2015 [Accessed 2015 January, 3]; Available from: https://www.isranews.org/content-page/67-south-slide/35565-eleven_35565.html.
34. Freudenrich, C. *How IEDs Work*. 2008 [Accessed 2008 December 10]; Available from: <http://science.howstuffworks.com/ied.htm>.
35. Butler, J.M., *DNA Biology Review*, in *Forensic DNA typing*. 2005, Elsevier Academic Press: USA.
36. Butler, J.M., *Forensic DNA typing*. 2 ed. 2005, Elsevier Academic Press: USA.

37. Van Oorschot, R.A.H., Ballantyne, K.N., and Mitchell, R.J., *Forensic trace DNA: a review*. Invest. Genet., 2010. 1(1): p. 14.
38. Hoffmann, S.G., Stallworth, S.E., and Foran, D.R., *Investigative studies into the recovery of DNA from improvised explosive device containers*. J. Forensic Sci., 2012. 57(3): p. 602-609.
39. Kishore, R., Reef Hardy, W., Anderson, V.J., Sanchez, N.A., and Buoncristiani, M.R., *Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48*. J. Forensic Sci., 2006. 51(5): p. 1055-1061.
40. Colussi, A., Viegas, M., Beltramo, J., and Lojo, M., *Efficiency of DNA IQ System® in recovering semen DNA from cotton swabs*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2009. 2(1): p. 87-88.
41. Phillips, K., McCallum, N., and Welch, L., *A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100(R) and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated)*. Forensic Sci. Int. Genet., 2012. 6(2): p. 282-285.
42. Verdon, T.J., Mitchell, R.J., and Van Oorschot, R.A.H., *Evaluating the efficiency of DNA extraction methods from different substrates*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2011. 3(1): p. e93-e94.
43. Zon, L.I., Dorfman, D.M., and Orkin, S.H., *The polymerase chain reaction colony miniprep*. Biotechniques, 1989. 7(7): p. 696-698.
44. Ottens, R., Templeton, J., Paradiso, V., Taylor, D., Abarino, D., and Linacre, A., *Application of direct PCR in forensic casework*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2013. 4(1): p. e47-e48.
45. Templeton, J.E., Taylor, D., Handt, O., Skuza, P., and Linacre, A., *Direct PCR improves the recovery of DNA from various substrates*. J. Forensic Sci., 2015. 60(6): p. 1558-1562.
46. Templeton, J.E. and Linacre, A., *DNA profiles from fingerprints*. Biotechniques, 2014. 57(5): p. 259-266.
47. Hedman, J., Nordgaard, A., Dufva, C., Rasmusson, B., Ansell, R., and Radstrom, P., *Synergy between DNA polymerases increases polymerase chain reaction inhibitor tolerance in forensic DNA analysis*. Anal. Biochem., 2010. 405(2): p. 192-200.

48. Mull, D.S., Liebermann, T.D., Smoot, J.L., and Woosley, L.H., *Application of dye-tracing techniques for determining solute-transport characteristics of ground water in karst terranes*. Env. Protect. Agency, 1988. p. 117.
49. Hennig, A., Bakirci, H., and Nau, W.M., *Label-free continuous enzyme assays with macrocycle-fluorescent dye complexes*. Nat. Methods, 2007. 4(8): p. 629-632.
50. Haines, A.M., Tobe, S.S., Kobus, H.J., and Linacre, A., *Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis*. Electrophoresis, 2015. 36(6): p. 941-944.
51. Hoshi, H., O'Brien, J., and Mills, S.L., *A novel fluorescent tracer for visualizing coupled cells in neural circuits of living tissue*. J. Histochem. Cytochem., 2006. 54(10): p. 1169-1176.
52. Carlsson, C., Larsson, A., Björkman, M., Jonsson, M., and Albinsson, B., *Experimental and simulated fluorescence depolarization due to energy transfer as tools to study DNA-dye interactions*. Biopolymers, 1997. 41(5): p. 481-494.
53. Thermo Fisher Scientific corporation, *Monomeric Cyanine Nucleic Acid Stains*. 2006.
54. Todor, G.D., Stefka, K., and Juan, J.V., *Intercalating cyanine dyes for nucleic acid detection*. Recent Pat. Materials Sci., 2009. 2(1): p. 1-26.
55. Wlodkowic, D., Skommer, J., and Darzynkiewicz, Z., *SYTO probes in the cytometry of tumor cell death*. Cytometry A, 2008. 73(6): p. 496-507.
56. Thermo Fisher Scientific corporation, *SYTO® Red Fluorescent Nucleic Acid Stains*, 2001.
57. Thermo Fisher Scientific corporation, *SYTOX® Blue Dead Cell Stain*. 2005.
58. Thermo Fisher Scientific corporation, *SYTOX® Green Nucleic Acid Stain*. 2006.
59. Thermo Fisher Scientific corporation, *SYTOX Orange Nucleic Acid Stain (S-11368)*. 2001.
60. Thermo Fisher Scientific corporation, *SYTOX® Red Dead Cell Stain*. 2006.
61. Singer, V.L., Jones, L.J., Yue, S.T., and Haugland, R.P., *Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation*. Anal. Biochem., 1997. 249(2): p. 228-238.

62. Moniee, M., Zhu, X., Tang, L., Juhler, S., Nuwaiser, F.I., Sanders, P.F., and Abeedi, F., *Optimization of DNA staining technology for development of autonomous microbe sensor for injection seawater systems*. J. Sens. Technol., 2016. 6(3): p. 27.
63. Cosa, G., Focsaneanu, K.S., McLean, J.R., McNamee, J.P., and Scaiano, J.C., *Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution*. Photochem. Photobiol., 2001. 73(6): p. 585-599.
64. Thermo Fisher Scientific corporation, *SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain*. 2006.
65. Thermo Fisher Scientific corporation, *SYBR® Safe DNA Gel Stain*. 2007.
66. Lepecq, J.B. and Paoletti, C., *A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization*. J. Mol. Biol., 1967. 27(1): p. 87-106.
67. Sabnis, R.W., *Handbook of biological dyes and stains*. 1 ed. 2010, John Wiley & Sons, Inc: Canada.
68. Bolton, P.H. and Kearns, D.R., *Spectroscopic properties of ethidium monoazide: a fluorescent photoaffinity label for nucleic acids*. Nucleic Acids Res., 1978. 5(12): p. 4891-4903.
69. Pan, Y. and Breidt, F., *Enumeration of viable Listeria monocytogenes cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells*. Appl. Environ. Microbiol., 2007. 73(24): p. 8028-8031.
70. Yielding, L.W., Brown, B.R., Graves, D.E., and Yielding, K.L., *Ethidium bromide enhancement of frameshift mutagenesis caused by photoactivatable ethidium analogs*. Mutat. Res., 1979. 63(2): p. 225-232.
71. Shumilov, D., *New application of acridine orange to study biophysics of exocytotic processes in cell*. 2013, Texas Christian University.
72. Arshad, R., Farooq, S., Iqbal, N., and Ali, S.S., *Mutagenic effect of acridine orange on the expression of penicillin G acylase and beta-lactamase in Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol., 2006. 42(2): p. 94-101.
73. Busto, N., Garcia, B., Leal, J.M., Gaspar, J.F., Martins, C., Boggioni, A., and Secco, F., *ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxy acridine) forms three complexes in the presence of DNA*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2011. 13(43): p. 19534-19545.

74. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., and Vitzthum, F., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. *Nucleic Acids Res.*, 2004. 32(12): p. e103.
75. Zelenin, A.V., Poletaev, A.I., Stepanova, N.G., Barsky, V.E., Kolesnikov, V.A., Nikitin, S.M., Zhuze, A.L., and Gnutchnev, N.V., *7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry*. *Cytometry*, 1984. 5(4): p. 348-354.
76. *Product Information*. EvaGreen Dye, 20X in water. 2007. 1-2.
77. Butler, J., *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodologies*. 2012, Massachusetts: Academic Press.
78. Nicklas, J.A. and Buel, E., *Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples*. *J. Forensic Sci.*, 2003. 48(5): p. 936-944.
79. Tyagi, S. and Kramer, F.R., *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization*. *Nat. Biotechnol.*, 1996. 14(3): p. 303-308.
80. Nicklas, J.A., Noreault-Conti, T., and Buel, E., *Development of a real-time method to detect DNA degradation in forensic samples*. *J. Forensic Sci.*, 2012. 57(2): p. 466-471.
81. Green, R.L., Roinestad, I.C., Boland, C., and Hennessy, L.K., *Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples*. *J. Forensic Sci.*, 2005. 50(4): p. 809-825.
82. Fregeau, C.J. and Laurin, N., *The Qiagen Investigator(R) Quantiplex HYres as an alternative kit for DNA quantification*. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2015. 16: p. 148-162.
83. Dilbeck, L., *Use of Bluestar Forensic in lieu of luminol at crime scenes*. *J. forensic identifi.*, 2006. 56(5): p. 706.
84. Jakovich, C.J., *STR analysis following latent blood detection by luminol, fluorescein, and bluestar*. *J. forensic identifi.*, 2015. 65(4): p. 693.
85. Blum, L., Esperanca, P., and Rocquefelte, S., *A new high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence*. *Can. So. Forensic Sci. J.*, 2006. 39(3): p. 81-99.

86. Brooks, E.M., Cullen, M., Szytdna, T., and Walsh, S.J., *Nuclear staining of telogen hair roots contributes to successful forensic nDNA analysis*. Au. J. Forensic Sci., 2010. 42(2): p. 115-122.
87. Lepez, T., Vandewoestyne, M., Van Hoofstat, D., and Deforce, D., *Fast nuclear staining of head hair roots as a screening method for successful STR analysis in forensics*. Forensic Sci. Int. Genet., 2014. 13: p. 191-194.
88. Haines, A.M., Tobe, S.S., Kobus, H., and Linacre, A., *Successful direct STR amplification of hair follicles after nuclear staining*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2015. 5: p. e65-e66.
89. Haines, A.M., Tobe, S.S., Kobus, H., and Linacre, A., *Duration of in situ fluorescent signals within hairs follicles*. Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 2015. 5: p. e175-e176.
90. Haines, A.M., Tobe, S.S., Kobus, H.J., and Linacre, A., *Effect of nucleic acid binding dyes on DNA extraction, amplification, and STR typing*. Electrophoresis, 2015. 36(20): p. 2561-2568.
91. *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in Water*. 2013. 1.
92. Dragan, A.I., Pavlovic, R., McGivney, J.B., Casas-Finet, J.R., Bishop, E.S., Strouse, R.J., Schenerman, M.A., and Geddes, C.D., *SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA*. J. Fluoresc., 2012. 22(4): p. 1189-1199.
93. Thakur, S., Cattoni, D.I., and Nollmann, M., *The fluorescence properties and binding mechanism of SYTOX green, a bright, low photo-damage DNA intercalating agent*. Eur. Biophys. J., 2015. 44(5): p. 337-348.
94. Quinones, I. and Daniel, B., *Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces*. Forensic Sci. Int. Genet., 2012. 6(1): p. 26-30.
95. Singer, V.L., Lawlor, T.E., and Yue, S., *Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test)*. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen., 1999. 439(1): p. 37-47.
96. Haines, A.M., Tobe, S.S., and Linacre, A., *Optimization of Diamond Nucleic Acid Dye for quantitative PCR*. BioTechniques, 2016. 61(4): p. 183-189.
97. Radvanszky, J., Surovy, M., Nagyova, E., Minarik, G., and Kadasi, L., *Comparison of different DNA binding fluorescent dyes for applications of high-resolution melting analysis*. Clin. Biochem., 2015. 48(9): p. 609-616.

98. Campbell, J.A., *Le Châtelier's principle, temperature effects, and entropy*. J. Chem. Educ., 1985. 62(3): p. 231.
99. *SYBR Nucleic Acid Gel Stains* 2003. 1-2.
100. Eggeling, C., Widengren, J., Rigler, R., and Seidel, C.A., *Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis*. Anal. Chem., 1998. 70(13): p. 2651-2659.
101. Ghauharali, R.I. and Brakenhoff, G.J., *Fluorescence photobleaching-based image standardization for fluorescence microscopy*. J. Microsc., 2000. 198 (Pt 2)(2): p. 88-100.
102. Ostojic, L. and Wurmbach, E., *Analysis of fingerprint samples, testing various conditions, for forensic DNA identification*. Sci. Justice, 2017. 57(1): p. 35-40.
103. Daly, D.J., Murphy, C., and McDermott, S.D., *The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood*. Forensic Sci. Int. Genet., 2012. 6(1): p. 41-46.
104. Butler, J.M., *Advance topics in forensic DNA typing: interpretation*. 1 ed. STR allele and amplification artifacts. 2015, USA: Elsevier Inc.
105. Gill, P., Whitaker, J., Flaxman, C., Brown, N., and Buckleton, J., *An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA*. Forensic Sci. Int., 2000. 112(1): p. 17-40.

ภาคผนวก

SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
2.0 X							
1.0 X							
0.9 X							
0.8 X							
0.7 X							
0.6 X							
0.5 X							
0.4 X							

ภาพที่ 1 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุพีวีซี โดยใช้สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

Diamond™ Nucleic Acid Dye							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
2.0 X							
1.0 X							
0.9 X							
0.8 X							
0.7 X							
0.6 X							
0.5 X							
0.4 X							



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายภาพเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัสดุพีวีซี โดยใช้สารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

SYTOX® Green Nucleic Acid Stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
2.0 X							
1.0 X							
0.9 X							
0.8 X							
0.7 X							
0.6 X							
0.5 X							
0.4 X							


ภาพที่ 3 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุพีวีซี โดยใช้สารเรืองแสง SYTOX® Green Nucleic Acid Stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

SYBR® Safe DNA Gel stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
20.0 X							
10.0 X							
9.0 X							
8.0 X							
7.0 X							
6.0 X							
5.0 X							
4.0 X							

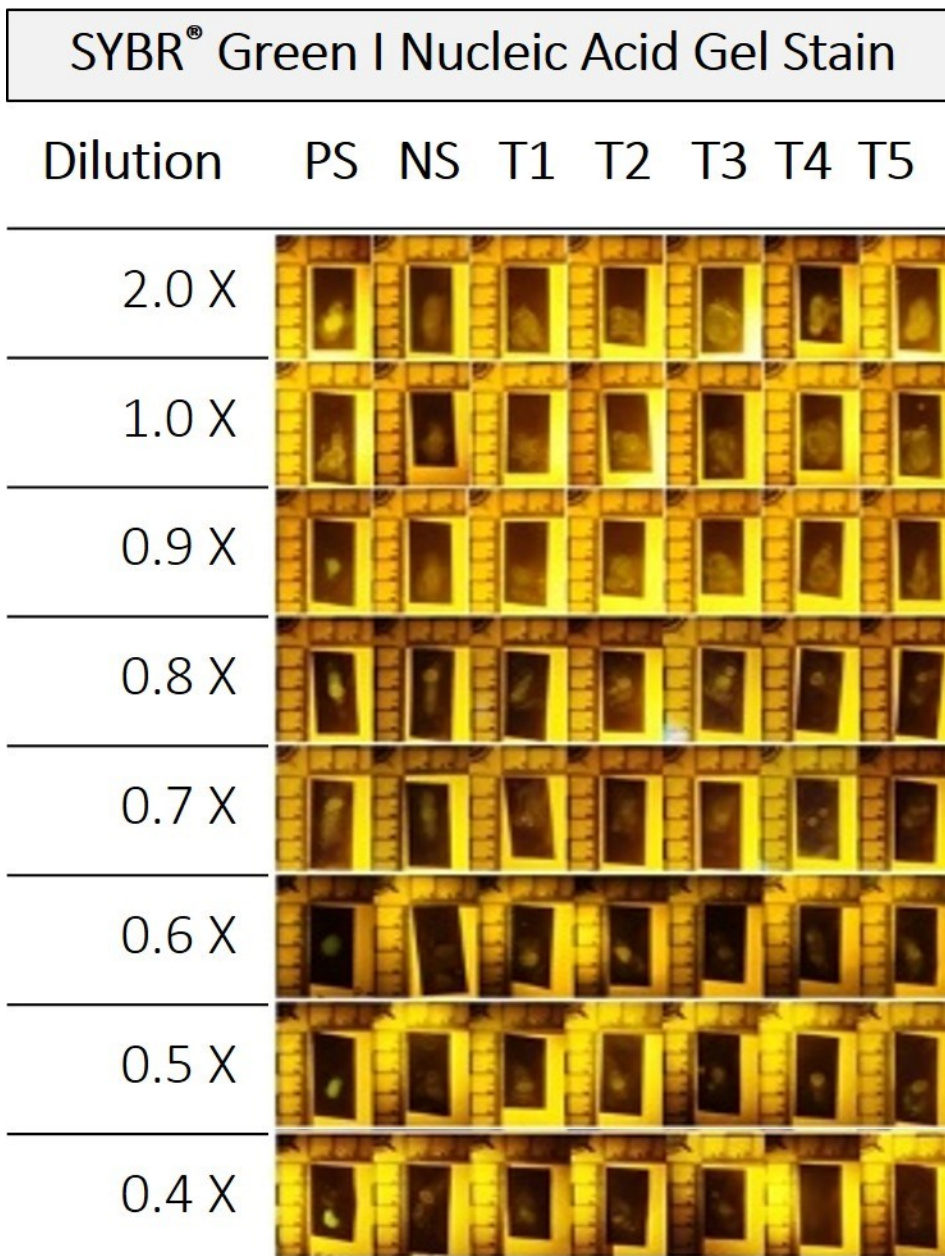
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุพีวีซี โดยใช้สารเรืองแสง SYBR® Safe DNA Gel stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
0.2 X							
0.1 X							

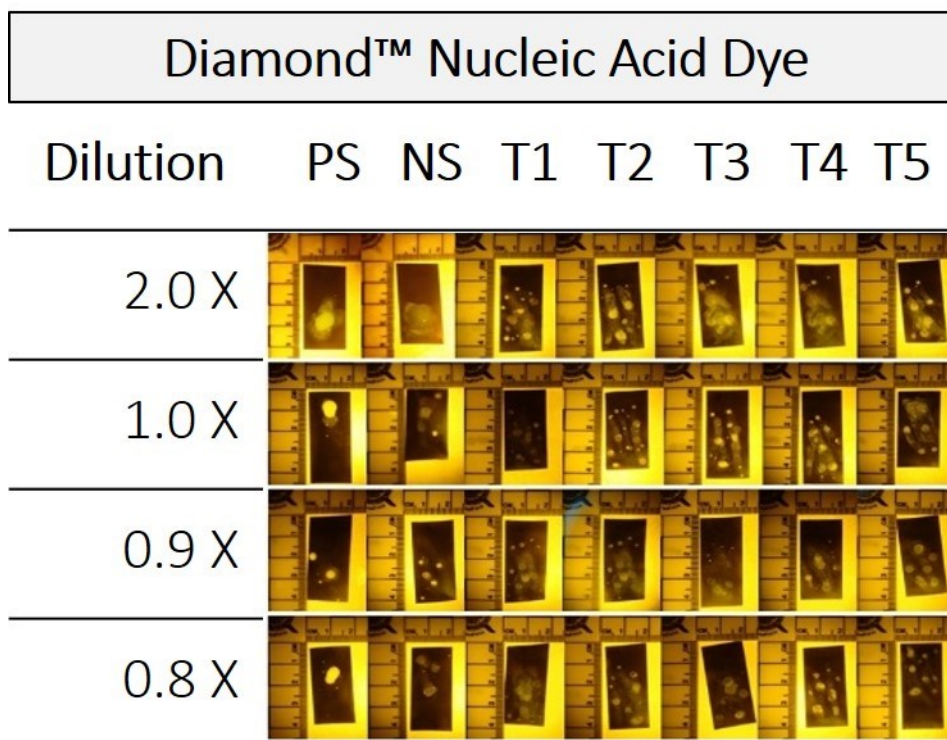
ภาพที่ 5 ภาพถ่ายภาพเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุพีวีซี โดยใช้สารเรืองแสง EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวก ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

GelRed™ Nucleic Acid Stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
100.0 X							



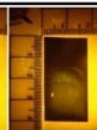
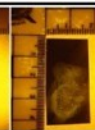
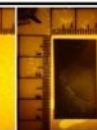
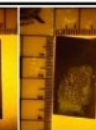
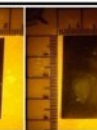

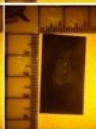
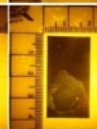


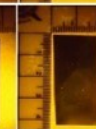
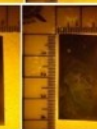
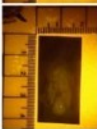
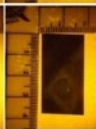
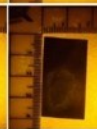



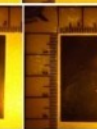
ภาพที่ 6 ภาพถ่ายภาพเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุพีวีซี โดยใช้สารเรืองแสง GelRed™ Nucleic Acid Stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)



ภาพที่ 7 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัสดุเทปพันสายไฟ โดยใช้สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)



ภาพที่ 8 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัสดุเทปพันสายไฟโดยใช้สารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

SYTOX® Green Nucleic Acid Stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
4.0 X							
3.0 X							
2.0 X							

ภาพที่ 9 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุเทพื้นสายไฟ โดยใช้สารเรืองแสง SYTOX® Green Nucleic Acid Stain ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

SYBR® Safe DNA Gel stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
20.0 X							
10.0 X							
9.0 X							

ภาพที่ 10 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัสดุเทปพันสายไฟ โดยใช้สารเรืองแสง SYBR® Safe DNA Gel stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain

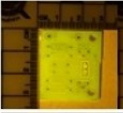


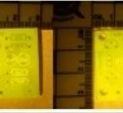



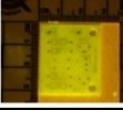

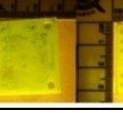

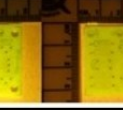


Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
0.2 X							
0.1 X							

ภาพที่ 11 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัสดุเทพพันสายไฟ โดยใช้สารเรืองแสง EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)



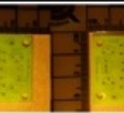




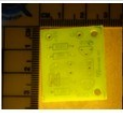
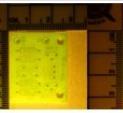
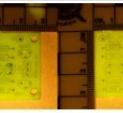
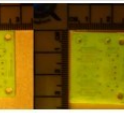
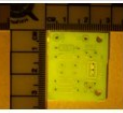
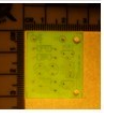

GelRed™ Nucleic Acid Stain

Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
100.0 X							

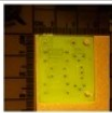
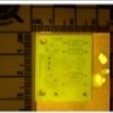


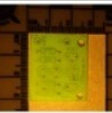
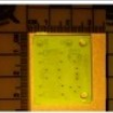

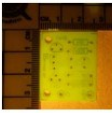
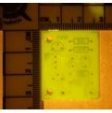
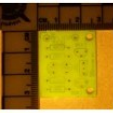
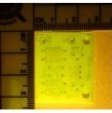
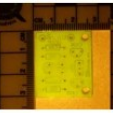

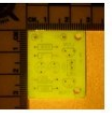
ภาพที่ 12 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัสดุเทพพันสายไฟ โดยใช้สารเรืองแสง GelRed™ Nucleic Acid Stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
100.0 X							
20.0 X							







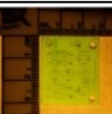
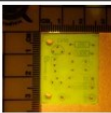
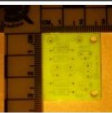

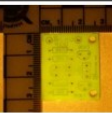


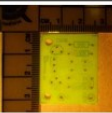
ภาพที่ 13 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัสดุแผงวงจรไฟฟ้า โดยใช้สารเรืองแสง SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

Diamond™ Nucleic Acid Dye							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
100.0 X							
20.0 X							

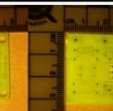
ภาพที่ 14 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัสดุแผงวงจรไฟฟ้า โดยใช้สารเรืองแสง Diamond™ Nucleic Acid Dye ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

SYTOX® Green Nucleic Acid Stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
100.0 X							
20.0 X							








ภาพที่ 15 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุแผงวงจรไฟฟ้า โดยใช้สารเรืองแสง SYTOX® Green Nucleic Acid Stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

SYBR® Safe DNA Gel stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
100.0 X							
20.0 X							

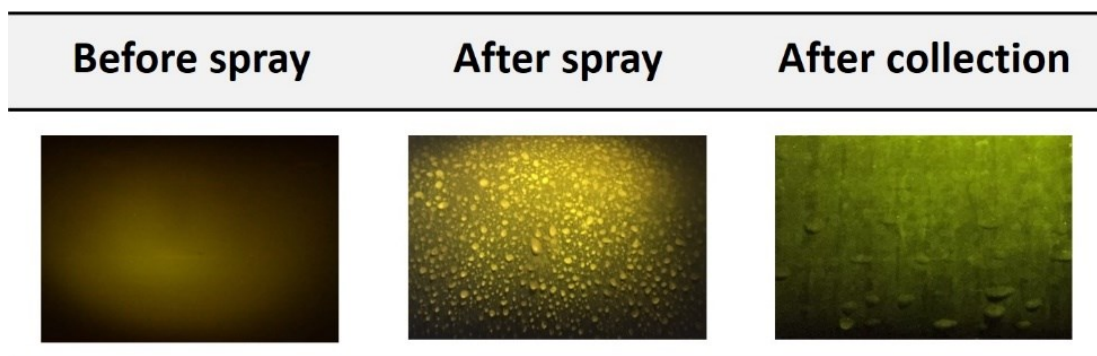
ภาพที่ 16 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุแผงวงจรไฟฟ้า โดยใช้สารเรืองแสง SYBR® Safe DNA Gel stain ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
20.0 X							
10.0 X							

ภาพที่ 17 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุแผงวงจรไฟฟ้า โดยใช้สารเรืองแสง EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)

GelRed™ Nucleic Acid Stain							
Dilution	PS	NS	T1	T2	T3	T4	T5
100.0 X							

ภาพที่ 18 ภาพถ่ายการเรืองแสงของดีเอ็นเอจากการสัมผัสกับวัสดุแผงวงจรไฟฟ้า โดยใช้สารเรืองแสง GelRed™ Nucleic Acid Stain ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ประกอบด้วย ตัวควบคุมทางบวกซึ่งเป็นดีเอ็นเอสกัดความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (PS; Positive substrate) ตัวควบคุมทางลบซึ่งเป็นวัสดุเปล่าที่ไม่มีดีเอ็นเอ (NS; Negative substrate) และตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (T1 ถึง T5)



ภาพที่ 19 ภาพถ่ายทอพีวีซีที่ใช้เป็นส่วนส่วนประกอบหนึ่งของระเบิดแสงเครื่องจำลองภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรจากแหล่งกำเนิดแสงทางเล็อกและถ่ายผ่านแว่นกรองความยาวคลื่นแสง ประกอบด้วยภาพก่อนและหลังจากสเปรย์ด้วยชุดน้ำยาสารเรืองแสง และภาพภายหลังการเก็บดีเอ็นเอที่เรืองแสงด้วยไม้พันสำลี



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fgsigss

Touch DNA localization and direct PCR: An improved workflow for STR typing from improvise explosive devices

P. Tonkrongjun^a, P. Thanakiatkrai^a, S. Phetpeng^b, W. Asawutmangkul^c, S. Sotthibandhu^d, T. Kitpipit^{a,*}

^a Forensic Science Program, Department of Applied Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand

^b Police Forensic Science Center 10, Royal Thai Police, Thailand

^c Institute of Forensic Medicine, Royal Thai Police, Thailand

^d Central Police Forensic Science Division, Royal Thai Police, Thailand



ARTICLE INFO

Keywords:

Touch DNA

Improvise explosive devices (IEDs)

Direct PCR

ABSTRACT

Improvise explosive devices (IEDs) are used for terrorism worldwide. Bomb assemblers could leave touch DNA on IED surfaces but most result in low STR typing success rate. Part of this is due to being unable to locate touch DNA on the evidence. In order to solve this problem, we investigated the efficiency of three fluorescent dyes to locate touch DNA on the two IED substrates (PVC pipe and electrical tape). Different areas with high and low touch DNA concentrations were distinguishable. Afterward, the stained samples were amplified by using direct PCR. The results showed that it was possible to obtain a high partial profile from a sample that had been touched for 15–30 s. The developed method (reagent, light source, and direct PCR) has the potential to transform the way forensic scientists work with evidence potentially containing touch DNA.

1. Introduction

Improvise explosive devices are used by terrorists worldwide. Touch DNA from bomb assemblers usually yields low success rate due to the inability to locate the areas where DNA has been left [1]. Previous studies showed that touch DNA and other biological fluids could be stained with a fluorescent dye but STR typing was unsuccessful because the dyes interrupt DNA extraction and other processes [2,3]. In this study, we therefore investigated the efficiency of three fluorescent dyes to locate touch DNA on the IED substrates. We then developed a direct PCR protocol to improve quality of STR profile obtained from the stained samples.

2. Materials and methods

Ten pieces each of two IED substrates – PVC pipes and electrical tapes – were cleaned of exogenous DNA before being touched by 10 volunteers. Three fluorescent dyes including Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, U.S.A.), EvaGreen™ Fluorescent DNA Stain (Biotium, U.S.A.) and SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, U.S.A.) were opti-

mized by evaluating different concentrations suitable for visualization of touch DNA on those substrates. The dyes were sprayed on the prepared substrates and visualized under an alternative light source (Polilight PL500) using the appropriate excitation wavelengths and filter glasses. Then, the fluorescing stains were collected using EO cotton swab (Thai Gauze, Thailand) and amplified using our developed direct PCR protocol. STR amplification was performed using Identifier Plus (Thermo Fisher, U.S.A). STR products were separated and detected using ABI310 (Thermo Fisher, U.S.A.).

3. Results and discussion

3.1. The comparison of fluorescent dyes for touch DNA visualization

Fig. 1 shows the use of three fluorescent dyes for staining touch DNA on PVC pipes and electrical tapes ($N = 10$ per dye per substrate). The lowest dilution in which Diamond Dye could be distinguishable from background in both substrates' replicates was 1:7000 in DNA-free water. The lowest dilution for SYBR Safe to fluoresce consistently and distinguishably was at 1:700 and for Evagreen this was 1:100. This

* Corresponding author at: 15 Karnjanavanich Road, Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand.
E-mail address: thitika.k@psu.ac.th (T. Kitpipit).

<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.228>

Received 4 September 2017; Accepted 24 September 2017

Available online 13 December 2017

1875-1768/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

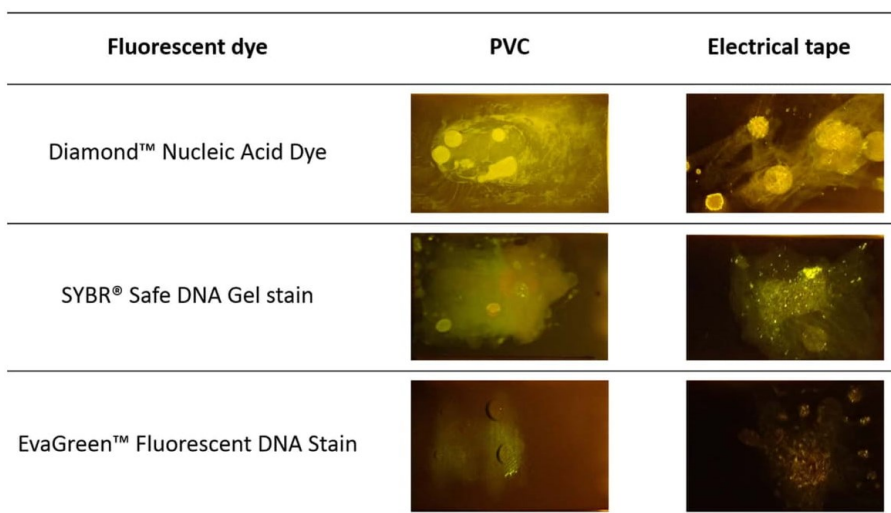


Fig. 1. Photos (1 × magnification) of the stained touch DNA on PVC pipes and electrical tapes using three fluorescent dyes ($N = 10$ per substrate per dye).

difference could be due to the difference in DNA binding mechanism, stock concentration, and proprietary properties of each dye. Hence, we selected Diamond Dye as a touch DNA visualization reagent. Background fluorescence mentioned in a previous study [2] due to bacterial DNA was also seen in this study.

3.2. Direct PCR of stained samples

The stained touch DNA produced high and low partial DNA profiles in all replicates (Fig. 2). Since the donors' STR profiles were known, the typed alleles could be classified as correctly typed alleles and non-donor alleles that could have resulted from secondary transfer. The profiles showed patterns associated with PCR inhibition, suggesting that Diamond Dye might have detrimental effects on the PCR process. Degradation of DNA was ruled out as the time between touch DNA deposition and profiling was only 24 h. Improvements to the preparation of the dyes or the collection process could increase the number of alleles obtained.

4. Conclusions

We successfully developed a DNA detection reagent to visualize touch DNA on IED substrates and could produce STR profiles by using direct PCR technique simultaneously. Localization of touch DNA on IED substrates could save time and budget for forensic scientists and has great potential. Further adjustments to improve the quality of STR profiles obtained and further investigations into the stability of the dyes, the mechanism of binding, the interference of dyes to PCR amplifications, and applications to real casework samples still need to be performed.

Conflict of interest

None.

Role of funding

Space Technology and Security Industry Program (SSIP), Industry Division, Thailand Research Fund (TRF) (grant no. RDG6050130).

DIAMOND DYE

■ Donor's allele ■ Other's allele

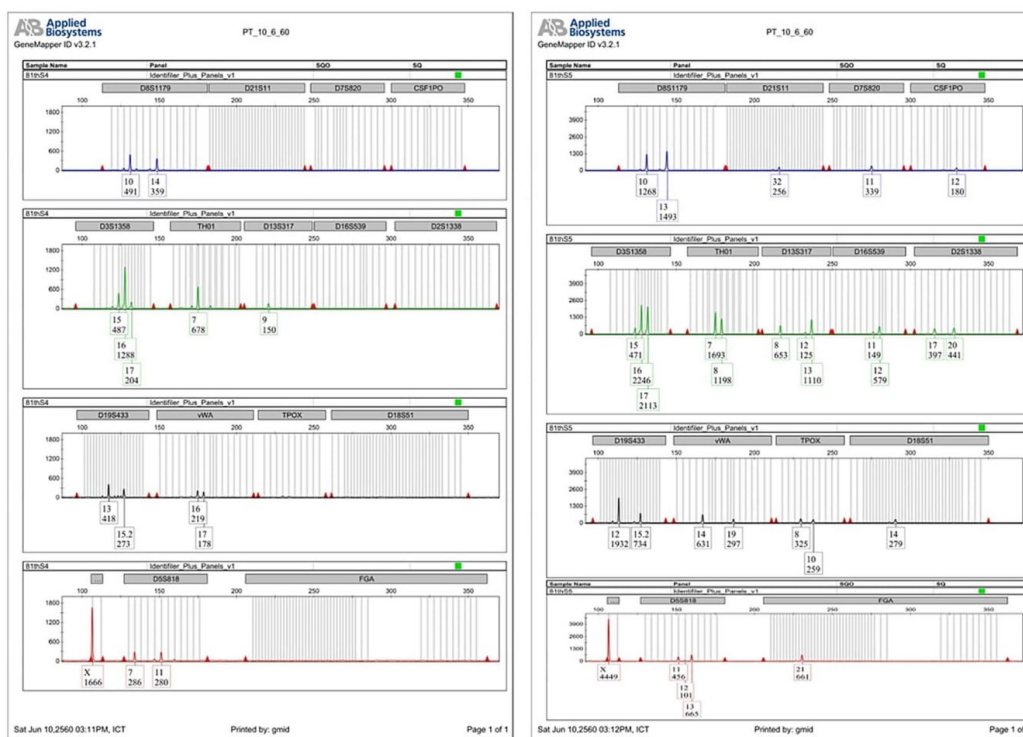
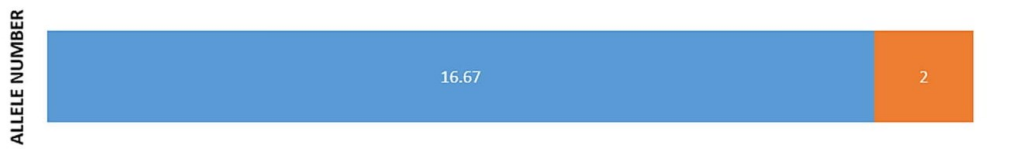


Fig. 2. The average number of alleles obtained and two representative STR profiles obtained with direct PCR protocol from stained touch DNA are shown.

Acknowledgements

Police Forensic Science Center 10 and Institute of Forensic Medicine, Royal Thai Police, Thailand and Center for Genomics and Bioinformatics Research, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

References

- [1] D.J. Daly, C. Murphy, S.D. McDermott, The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 41–46.
- [2] A.M. Haines, et al., Finding DNA: using fluorescent in situ detection, *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser.* 5 (2015) e501–e502.
- [3] A.M. Haines, et al., Effect of nucleic acid binding dyes on DNA extraction: amplification, and STR typing, *Electrophoresis* 36 (20) (2015) 2561–2568.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวเปรมกมล ตันครองจันทร์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5810220048	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2557

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนอุดหนุนการศึกษาเป็นผู้ช่วยวิจัย (Research Assistant) ปีการศึกษา 2558 (สัญญาเลขที่ 1-2558-02-004) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Tonkrongjun, P., P. Thanakiatkrai, S. Phetpeng, W. Asawutmangkul, S. Sotthibandhu, and T. Kitpipit. 2017. "Touch DNA localization and direct PCR: An improved workflow for STR typing from improvise explosive devices." *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* no. 6:e610-e612.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.228>.